

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja BENČINA

**PRIMERJAVA ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG IMMUNOGLOBULINOV
PRI REDU Galliformes**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF LIGHT CHAIN IMMUNOGLOBULIN
SEQUENCES IN Galliformes**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Z diplomskim delom zaključujem univerzitetni dodiplomski študij biologije. Diplomsko naloga je bila opravljena v Laboratoriju za genetiko na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete na Rodici pri Domžalah.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je odobrila prijavljeno diplomsko delo in za mentorja imenovala prof. dr. Petra Dovča, za recenzenta prof. dr. Vladimirja Kotnika ter za predsednika prof. dr. Miklavža Grabnarja.

Mentor: prof. dr. Peter Dovč

Recenzent: prof. dr. Vladimir Kotnik

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: prof. dr. Miklavž Grabnar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Člani: prof. dr. Peter Dovč
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

prof. dr. Vladimir Kotnik
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora: 17.06.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mateja Benčina

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 577.27:598.2(043.2)=163.6

KG imunoglobulini/ptice/lahke verige/verižna reakcija s polimerazo/določitev nukleotidnega zaporedja/monoklonska protitelesa proti lahkim verigam/encimskoimunski testi

KK

AV BENČINA, Mateja

SA DOVČ, Peter (mentor)/KOTNIK, Vladimir (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2009

IN PRIMERJAVA ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG IMUNOGLOBULINOV PRI REDU Galliformes

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP IX, 95 str., 11 pregl., 18 sl., 4 pril. 70 vir

IJ sl

JI sl/en

AI Pri vretenčarjih so imunoglobulini (Ig) osnovni element obrambe pri okužbah z različnimi patogenimi mikroorganizmi. Z izjemo kokoši in rac, je pri pticah struktura Ig slabo raziskana. Zato smo želeli z uporabo dveh monoklonskih protiteles (mAb) za lahke verige (Lv) kokošjih Ig in z določitvijo delnih zaporedij Lv navadnega fazana, purana in poljske jerebice pridobiti nove informacije o strukturi in sorodnosti njihovih Lv. MAb 3C10 je v encimskoimunskih testih reagiralo z Lv ali Ig kokoši, različnih rodov fazanov, purana, pava, tragopana, pegatke in beloglavega jastreba. Referenčno mAb CH-31 (Sigma) je pokazalo podobno reaktivnost (specifičnost), vendar pa ni prepoznavalo Ig pegatke. Analiza je pokazala, da je N- terminalno aminokislinsko (ak) zaporedje (19 ak) in delno ak zaporedje Lv navadnega fazana (10 ak pred CDR3 domeno) identično ustreznim zaporedjem Lv kokoši. Z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo pomnožili odseke DNA. Tako je bilo določeno zaporedje (154 nukleotidov (nt)), ki vključuje joining del Lv (jLv) (39 nt) sledečih vrst ptic: purana, navadnega fazana, poljske jerebice ter pava. Prav tako smo določili tudi zaporedje (646-656 nt), ki vključuje konstantni del Lv (kLv) purana, navadnega fazana in poljske jerebice. Dobljena zaporedja smo primerjali z zaporedjem kokoši, izkazalo se je, da je zaporedje navadnega fazana najbolj podobno zaporedju kokoši (99% identičnost nt zaporedij jLv in 92% identičnost kLv zaporedij), medtem, ko je zaporedje purana najbolj podobno zaporedju poljske jerebice (98% identičnost nt zaporedij jLv ter 94% identičnost kLv zaporedij).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.27:598.2(043.2)=163.6

CX immunoglobulins/birds/light chains/polymerase chain reaction/determination of nucleotide sequences/monoclonal antibodies to light chains/immuno-enzyme tests

CC

AU BENČINA, Mateja

AA DOVČ, Peter (supervisor)/KOTNIK, Vladimir (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI COMPARISON OF LIGHT CHAIN IMMUNOGLOBULIN SEQUENCES IN Galliformes

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 95 p., 11 tab., 18 fig., 4 ann., 70 ref.

LA sl

AL sl/en

AB In vertebrates immunoglobulins (Ig) represent essential elements of their defence against infections caused by a variety of pathogens. Except for chickens and ducks, Igs structure(s) of other bird species have not been determined. Using two monoclonal antibodies (mAbs) to light chain (LC) of chicken IgG and with the determination of ring-necked pheasant, turkey and common partridge LC sequence we wanted to obtain novel information about the structure, as well as relatedness of their LC. Mab 3C10 reacted in immunoenzyme assays with LC of chicken, different genera of pheasants, turkey, peafowl, tragopan, guineafowl and Eurasian griffon. The reference mAb CH-31 (Sigma) showed similar pattern of reactivity, however, it did not recognise Igs of guineafowl. The N-terminal amino acid (aa) sequence (19 aa) and partial sequence of LC of ring-necked pheasant (10 aa upstream of CDR3 domain) were identical to those of the chicken LC. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the target DNA of LC in order to determine those sequences of regions coding for joining LC (jLC) and constant LC (cLC). Sequences (154 nucleotides (nt)) were determined for the region, which includes jLC (39 nt) of ring-necked pheasant, turkey, common partridge and peafowl. Sequences (646-656 nt) were determined also for the region, which includes cLC of turkey, ring-necked pheasant and common partridge. We compared sequences to those of chicken. The sequence of ring-necked pheasant is most related to those of chicken (99% identity in jLC and 92% identity in cLC region), whereas sequence of turkey is closer to the common partridge cLC sequence (98% identity in jLC and 94% identity in cLC region).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	2
1.2 NAMEN DELA.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 PTICE.....	4
2.1.1 Taksonomija ptic.....	4
2.1.1.1 Galloanseriformes je sestrška skupina preostalim sodobnim pticam.....	4
2.1.1.2 Morfološki opis reda kur (Galliformes) in sistematika na ravni družin.....	6
2.1.1.3 Molekulska filogenija in opredelitev skupine Galliformes.....	6
2.1.1.4 Morfološke analize in podprtost skupin znotraj reda Galliformes.....	7
2.1.1.5 Molekularne študije filogenetskih odnosov znotraj družine Phasianidae.....	8
2.1.1.5.1 Molekulske študije Ig naddružine.....	10
2.2 PROTITELESA- IMUNOGLOBULINI.....	10
2.2.1 Splošno o protitelesih.....	10
2.2.2 Podenote protiteles.....	11
2.2.3 Pregled razredov protiteles.....	13
2.2.4 Razredi protiteles ptic.....	13
2.2.5 Funkcije protiteles pri pticah.....	15
2.2.6 Struktura kokošjih IgG.....	17
2.2.7 Posebnost IgG (IgY) pri racah in genetsko ozadje.....	19
2.2.7.1 Genetsko ozadje okrnjene oblike IgG (IgY) pri racah.....	20
2.2.8 Vzorci glikozilacije Ig ptic.....	21
2.2.9 LAHKE IN TEŽKE VERIGE IMUNOGLOBULINSKIH MOLEKUL.....	21
2.2.9.1 Lahke verige imunoglobulinskih molekul vretenčarjev.....	21
2.2.9.2 Lahke verige kokošjih Ig.....	23
2.2.9.3 Organizacija Ig genov pri kokoši.....	24
2.2.9.3.1 Lokus za težke verige.....	24
2.2.9.3.2 Lokus za lahke verige.....	25
2.2.9.3.3 Preurejanje genov za Ig pri kokoših.....	26
2.2.9.3.4 Mehanizem somatske genske konverzije pri kokoših.....	27
2.2.9.3.5 Preurejanje genov za težke verige.....	28
2.2.9.3.6 Preurejanje genov za lahke verige.....	29
2.2.10 Modelna celična linija limfocitov B DT40.....	30
2.2.11 Evolucijska ohranjenost zaporedja konstantnega dela Lv.....	30
2.2.12 Skupne antigenske determinante kokoši in ostalih ptic družine Phasianidae ..	31
2.2.13 Dosedaj znana aminokislinska in nukleotidna zaporedja Lv ptic.....	32
3 MATERIALI IN METODE.....	34
3.1 LOČEVANJE PODENOT IMUNOGLOBULINOV Z ELEKTROFOREZO, PRENOS BELJAKOVIN NA MEMBRANO IN ENCIMSKOIMUNSKI TEST.....	34

3.1.1	Elektroforeza	34
3.1.2	Prenos beljakovin na membrano (angl. "western blotting")	34
3.1.3	Encimskoimunski test ("imunoblot")	35
3.1.4	Preverjanje aktivnosti mAb z metodo DIBA (angl. »dot-immunobinding assay«) 36	
3.1.4.1	Indirektni encimskoimunski test	36
3.1.4.2	Direktni encimskoimunski test	37
3.2	DOLOČITEV N- TERMINALNEGA ZAPOREDJA LAHKIH VERIG	38
3.2.1	N-terminalna analiza zaporedij lahkih verig	38
3.3	DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA	39
3.3.1	Izolacija DNA ptic	39
3.3.1.1	Izolacija DNA iz kulture kokošjih limfocitov B	39
3.3.1.2	Izolacija DNA iz tkiv ptic	40
3.3.1.3	Izolacija DNA iz celic eksudata sinusa pava in purana	40
3.3.1.4	Redčenje DNA (priprava delovne raztopine)	40
3.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	41
3.3.2.1	Elektroforeza DNA v agaroznem gelu	43
3.3.2.2	Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)	43
3.4	BIOINFORMACIJSKE METODE	44
3.4.1	Uporabljena programska orodja in analiza podatkov	44
4	REZULTATI	45
4.1	ENCIMSKOIMUNSKI TEST DIBA	45
4.1.1	Reakcije serumov ptic z mAb 3C10 v encimskoimunskem testu DIBA	45
4.1.2	Reakcije serumov ptic z referenčnim mAb CH-31	48
4.2	LOČEVANJE DELOV Ig Z ELEKTROFOREZO	48
4.2.1	Imunoblot	48
4.2.1.1	Reakcije mAb 3C10 z imunoglobulini različnih vrst ptic	48
4.2.1.2	Reakcije »nereduciranih« imunoglobulinov z mAb 3C10 in mAb CH-31 ..	48
4.2.1.3	Reakcije lahkih verig (Lv) imunoglobulinov z mAb 3C10 in CH-31	50
4.2.1.4	Vezava mAb 3C10 na native Ig	51
4.2.1.5	Primerjava reakcij mAb 3C10 in CH-31 s serumskimi Ig ptic	51
4.3	ANALIZA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG	53
4.4	ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG	53
4.4.1	Verižna reakcija s polimerazo	55
4.4.1.1	Pregled rezultatov verižnih reakcij s polimerazo	55
4.4.1.2	Analiza nukleotidnih zaporedij za jLv Ig z metodo verižne reakcije s polimerazo	56
4.4.1.2.1	Nukleotidno zaporedje jLv	57
4.4.1.2.2	Analiza nukleotidnega zaporedja jLv	57
4.4.1.3	Analiza nukleotidnih zaporedij kLv Ig purana, navadnega fazana in poljske jerebice 59	
4.4.1.3.1	Celotno nukleotidno zaporedje kLv	60
4.4.1.3.2	Analiza nukleotidnega zaporedja kLv	63
4.5	ANALIZA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG	64
4.5.1	Analiza napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv	64
4.5.2	Analiza napovedanih aminokislinskih zaporedij kLv	64
4.5.3	Analiza napovedanih in dejanskih aminokislinskih zaporedij Lv	66
4.5.4	Filogenetski odnosi med preučevanimi pticami	66

4.6	ANALIZA LASTNOSTI PROTEINOV Z BIOINFORMACIJSKIMI METODAMI	
	67	
4.6.1	Napoved teoretično najbolj antigene regije.....	67
4.6.2	Teoretične molske mase in izoelektrične točke proteinov	68
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	69
5.1	RAZPRAVA	69
5.1.1	ANTIGENSKA SORODNOST LAHKIH VERIG IMUNOGLOBULINOV PTIC	70
5.1.1.1	Lahke verige imunoglobulinov različnih redov/družin/rodov/vrst ptic imajo podobne antigenske determinante	70
5.1.1.1.1	Reakcije mAb 3C10 in CH-31 z vzorci serumov ptic v DIBA testih	71
5.1.1.1.2	Reakcije mAb 3C10 v imunoblotih.....	74
5.1.1.1.3	Kje na lahki verigi lahko leži epitop za mAb 3C10?	74
5.1.2	DOLOČITEV ZAPOREDIJ kLv PRI PURANU, FAZANU IN JEREBICI... ..	77
5.1.2.1	Primerjava nukleotidnih zaporedij	77
5.1.2.2	Primerjava napovedanih aminokislinskih zaporedij	78
5.1.2.2.1	Primerjava zaporedij za Lv	80
5.1.2.2.2	Filogenetsko drevo	81
5.2	SKLEPI	83
6	POVZETEK	84
7	VIRI.....	86
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Različni izotipi protiteles vretenčarjev (povzeto po: Honjo in sod., 2004).....	13
Preglednica 2: Razredi kokošjih Ig in njihove lastnosti (Ratcliffe, 2006).	15
Preglednica 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo.	42
Preglednica 4: Pregled uporabljenih bioinformacijskih metod.	44
Preglednica 5: Prikaz ocenjevanja velikosti reakcije serumskih Ig na primeru diamantnega fazana z mAb 3C10 in referenčnim CH-31 v DIBA testu.	46
Preglednica 6: Reakcije serumov ptic testiranih v DIBA testu z mAb 3C10 ter referenčnim komercialnim mAb CH-31 (Sigma).	47
Preglednica 7: Primerjava reakcij mAb 3C10 in komercialnega mAb CH-31 (Sigma).	52
Preglednica 8: Pregled izolacije genomske DNA iz različnih vrst ptic, začetni oligonukleotidi, velikost produktov verižne reakcije s polimerazo, številka zaporedja v GenBank.....	55
Preglednica 9: Odstotki podobnosti zaporedij: A- nukleotidnih, B- aminokislinskih.	65
Preglednica 10: Določitev teoretično najbolj antigene regije	68
Preglednica 11: Teoretična molska masa in izoelektrična točka proteinov (jLv+kLv) (ExpASy).	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz redov ptic ter delitev ptic na paleogratne in neogratne.	5
Slika 2: Klasifikacija poljskih kur (Phasianidae) ter sestrskih družin znotraj reda kur (Galliformes).	9
Slika 3: Primerjava strukture ptičjih IgG, sesalskih IgG ter IgE (Suzuki in Lee, 2004b).	17
Slika 4: Shematski prikaz strukture račjih protiteles.	20
Slika 5: Struktura kokošje Lv.	23
Slika 6: Organizacija lokusa lahke verige Ig pri kokoših (Ratcliffe, 2006).	25
Slika 7: Somatska genska konverzija.	29
Slika 8: Shematski prikaz regij, pomnoženih z verižno reakcijo s polimerazo.	41
Slika 9: Vezava mAb 3C10 na lahke verige (Lv) serumskih Ig v imunoblotu.	49
Slika 10: Vezava referenčnih mAb CH-31 na Lv serumskih Ig v imunoblotu.	50
Slika 11: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr.	56
Slika 12: Poravnava zaporedij za joining del Lv (jLv). Legenda: rumena barva: 5' konec pred jLv, roza: del, ki kodira jLv in temno zelena barva: 3' konec za jLv regijo.	57
Slika 13: Levo: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr. Desno: Shematski prikaz, kateri del gena Lv je bil analiziran.	59
Slika 14: Levo: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr. Desno: Shematski prikaz, kateri del gena Lv je bil analiziran.	59
Slika 15: Poravnava nukleotidnih zaporedij za kLv Ig (ClustalW).	62
Slika 16: Primerjava dobljenih napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv ter kLv navadnega fazana, poljske jerebice ter purana, z zaporedjem kokoši (GenBank, M24403).	65
Slika 17: Kladogram poravnave napovedanih aminokislinskih zaporedij (ClustalW) za jLv+kLv Ig.	66
Slika 18: Kladogram poravnave napovedanih aminokislinskih zaporedij (ClustalW) jLv+kLv galiformnih ptic ter race (GenBank, S49449).	67

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

A 1 Taksonomska uvrstitev preučevanih ptic

PRILOGA B

B1 Zaporedja za lahke verige

B 1.1 Zaporedja kLv

B 1.1.1 Nukleotidna zaporedja, ki vključujejo kLv

B 1.1.2 Napovedana aminokislinska zaporedja kLv

B 1.2 Zaporedja jLv

B 1.2.1 Nukleotidna zaporedja, ki vključujejo jLv (podčrtano)

B 1.2.2 Primerjava nukleotidnih zaporedij jLv

B 1.2.3 Napovedana aminokislinska zaporedja jLv

B 1.3 Združena napovedana aminokislinska zaporedja (jLv+kLv)

PRILOGA C

C 1 Encimskoimunski testi

C 1.1 Pregled serumov različnih vrst ptic, ki so bili testirani v encimskoimunskih testih

C 2 DIBA test z mAb 3C10 in CH-31, ki prepoznavajo lahke verige

C 3 DIBA test z mAb 1F5 in M1, ki prepoznavajo težke verige

C 4 Imunoblot z mAb, ki prepoznavajo težke verige

PRILOGA D

D 1 Verižna reakcija s polimerazo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo (angl. »antibody«)
AMS	amonijev sulfat
CAPS	pufer za prenos na membrano (angl. »3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid«)
CDR	hipervariabilne ali komplementarnost določujoče regije (angl. »complementarity determining region«)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. »deoxyribonucleic acid«)
DIBA	encimskoimunski test (angl. »dot-immunobinding assay«)
ELISA	encimskoimunski test (angl. »enzyme-linked immunosorbent assay«)
Fab	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz dela težke in celotne lahke verige
Fc	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz konstantnih delov obeh težkih verig
GenBank	podatkovna zbirka na NCBI
Ig	imunoglobulin(i)- protitelesa
IgA	imunoglobulini razreda A
IgD	imunoglobulini razreda D
IgE	imunoglobulini razreda E
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
IgY	imunoglobulini razreda Y
kDa	merska enota kilodalton
Lv	lahka veriga imunoglobulinov
mAb	monoklonsko protitelo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pAb	poliklonsko protitelo
PBST	fosfatni pufer z dodatkom detergenta Tween 20
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. »polymerase chain reaction«)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. »sodium dodecylsulphate«)
Tv	težka veriga imunoglobulinov
v-, j-, kLv	variabilni, združevalni, konstantni del lahke verige imunoglobulinov
v-, j-, kTv	variabilni, združevalni, konstantni del težke verige imunoglobulinov
β-ME	beta merkaptoetanol

1 UVOD

Sodobne ptice označuje mnogo sinapomorfij, med njimi so najbolj očitne perje, prednje okončine preoblikovane v peruti, mnoge anatomske in skeletne posebnosti ter visoka stalna telesna temperatura okrog 40°C. Med kopenskimi vretenčarji so ptice številčno najbolj zastopan razred, saj poznamo okrog 9000 vrst ptic, kar je več kot dvakrat toliko, kot je znanih vrst sesalcev na Zemlji. Preživetje do danes, izjemno številčnost in razširjenost ptic povezujejo z njihovo zmožnostjo leta, ki zahteva posebne aerodinamične, mehanske ter energetske prilagoditve, ki se kažejo v zgradbi telesa, fiziologiji, vedenju ter velikem delu ekologije sodobnih ptic (Trontelj, 2008).

Ptice imajo tipičen vretenčarski prilagodljiv imunski sistem, ki proizvaja protitelesa. Študije imunoglobulinov so omejene večinoma na galiformne in anseriformne ptice.

Imunski sistem domače kokoši je med pticami najbolj preučen. Prednost pri preučevanju imunskega sistema pa predstavlja tudi možnost točnega razločevanja ter lahka dostopnost v vseh fazah zarodkovega razvoja. Zato je imunski sistem ptic neprecenljiv model za študije osnov imunologije, saj so se ptice in sesalci razvili iz skupnega plazilskega prednika pred več kot 200 milijoni let in so tako podedovali mnoge skupne imunološke značilnosti (Davidson in sod., 2008).

Poliklonska protitelesa razreda IgG ptic (imenovana tudi IgY) lahko izoliramo iz rumenjaka. Izolacija IgY je enostavnejša, bolj ekonomična, bolj specifična in hitrejša od izolacije sesalskih protiteles. Uporaba ptičjih protiteles predstavlja tako zmanjšanje stroškov in časa ter pomeni izboljšavo pri uporabi živalskih protiteles (Karlsson in sod., 2004).

Sesalska monoklonska protitelesa proti kokošjim IgG, ki reagirajo tudi z Ig drugih vrst ptic, so potencialno uporabna v diagnostičnih testih za določevanje specifičnih protiteles in s tem tudi okužb perutnine, zlasti v intenzivni reji. Zato si preliminarni testi, s katerimi ugotavljamo reakcije mAb ter njihovo potencialno uporabnost za diagnostiko, zaslužijo posebno pozornost.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V Laboratoriju za imunologijo in celične kulture Oddelka za zootehniko so pridobili monoklonska protitelesa (mAb) proti različnim determinantom na kokošjih IgG. Ugotovili so tudi navzkrižne reakcije mAb s protitelesi (iz serumov ali rumenjaka) IgG drugih ptic.

Predhodne raziskave so pokazale, da monoklonsko protitelo mAb 3C10 prepozna epitop na lahkih verigah (Lv) kokošjih imunoglobulinov (Ig) in da je tak epitop tudi na Lv Ig purana in fazana (Narat in sod., 2004).

Domnevali smo, da epitopi za mAb 3C10 ležijo na konstantnem delu Lv, in da so osnova za prepoznavanje mAb 3C10 puranjih in fazanjih Lv podobna aminokislinska zaporedja. Za ugotovitev dejstva, da so zaporedja pri puranu, fazanu in sorodnih pticah na konstantnem delu Lv res podobna, je potrebno poznati zaporedja, vendar ta niso bila znana. Predhodno so bila namreč omenjena zaporedja Lv znana le za kokoš in raco.

1.2 NAMEN DELA

Prvi namen naloge je bil, da ugotovimo ali so epitopi za mAb 3C10 prisotni tudi na Ig (oz njihovih Lv) pri drugih vrstah ptic, katerih serumi še niso bili preiskani.

Pričakovali smo, da bomo z razširitvijo izbora testiranih ptic ugotovili, da mAb 3C10 prepozna Ig oz. lahke verige tudi pri drugih vrstah ptic, zlasti pri tistih iz družine Phasianidae.

Naš namen je bil dokazati, da determinante, ki so skupne tudi evolucijsko manj sorodnim pticam (kot se je izkazalo pri pegatki in beloglavem jastrebu), ki pripadajo različnim redovom (Galliformes, Falconiformes) res ležijo na lahkih verigah.

Ker imajo variabilni deli lahkih verig pri kokoših razlike v številu in zaporedju aminokislin (Parvari in sod., 1987; 1990), smo predpostavljali, da mAb 3C10 prepozna epitop, ki leži v konstantni regiji lahke verige. Ta regija pri kokoših vključuje aminokislinske 104-206 (Reynaud in sod., 1983). Zelo verjetno je, da je osnova za navzkrižno reaktivnost mAb 3C10 podobno aminokislinsko zaporedje v konstantni regiji lahkih verig Ig. Ohranjenost konstantnega dela lahkih verig pri drugih razredih vretenčarjev (ribah, sesalcih) so opisali že Greenberg in sod. (1993).

Domnevali smo, da bomo s primerjavami aminokislinskih zaporedij lahkih verig, zlasti konstantne regije, lahko sklepali na prisotnost epitopa, ki ga prepozna mAb 3C10.

Bolj natančno smo želeli raziskati možno pozicijo epitopa, ki ga prepozna mAb 3C10 in primerjati napovedano aminokislinsko zaporedje na ustreznem delu lahkih verig pri različnih vrstah ptic.

Zaporedja za lahko verigo so bila znana samo za kokoš ter dve različni vrsti rac (moskovsko in raco mlakarico).

Drugi namen naloge je bil, da določimo še neznana aminokislinska zaporedja Lv (Ig) ptic, katerih Lv prepozna mAb 3C10. Sprva smo z N- terminalno sekvenčno analizo želeli določiti N- terminalno zaporedje Lv. Takšne raziskave so drage in jih opravljajo samo ustrezno opremljeni laboratoriji, zato smo v te vrste analizo poslali le 3 vzorce (Lv navadnega in diamantnega fazana ter beloglavega jastreba). Drugi pristop za določitev nukleotidnega zaporedja, ki določa konstantni del Lv (kLv) in joining del (jLv) je temeljil na pomnoževanju ustreznih zaporedij z metodo verižne reakcije s polimerazo in njihov prevod v aminokislinska zaporedja. Želeli smo določiti delna zaporedja (nukleotidna in napovedana aminokislinska) Lv različnih vrst ptic znotraj reda Galliformes in s primerjavo le-teh ugotoviti sorodstvene odnose med njimi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PTICE

2.1.1 Taksonomija ptic

Vzporedno z uporabo novih analitičnih metod se je filogenetsko drevo ptic v zadnjih nekaj desetletjih precej spremenilo. Čeprav so si mnoge filogenetske razvejitve zelo nasprotujoče, je vseeno morfološko in molekularno dobro podprta delitev monofiluma sodobnih ptic (Neornithes) na paleognatne (staročeljustne) in neognatne (novočeljustne) (van Tuinen in sod., 2000).

Med paleognatne (Paleognathae) ptice sodijo redovi nojevcev, ameriških tekačev, kivijev ter avstralskih tekačev, vsi ostali redovi pa so iz nadreda neognatnih ptic (Neognathae).

Neognatne imajo na prsnici razvit greben, lahko in gibljivo lobanjo, pregradna kost v nosu (vomer) je bolj reducirana kot pri paleognatnih. V velikih kosteh so zračne votline, kosti oplečja in trtična kost ter perje so dobro razviti (Ognev, 1956).

2.1.1.1 Galloanseriformes je sestrsk skupina preostalim sodobnim pticam

Galloanseriformes je nadred, ki združuje red plovcev (Anseriformes), kamor so taksonomsko uvrščene race, gosi, labodi in red kur (Galliformes), znotraj katerega uvrščamo 5 družin, med njimi tudi družino poljskih kur (Phasianidae).

Mitohondrijski ribosomalni geni kažejo na to, da so paleognatne ptice monofiletske ter da so galoanserine ptice sestrsk skupina vsem ostalim neognatnim pticam (Neoaves). Ohranjena nukleotidna zaporedja sama niso zadosten podatek za razrešitev vprašanja monofiletskosti nadreda Galloanseriformes, vendar nakazujejo, da so rasa, kokoš in hokohojke (Cracidae) izvorni neognati (van Tuinen in sod., 2000).

V nadaljevanju (Slika 1) je prikaz redov sodobnih ptic.



Slika 1: Prikaz redov ptic ter delitev ptic na paleognatne in neognatne.

Redovi (povzeto po: Trontelj, 2008), katerim pripadajo ptice, ki smo jih preučevali v tej nalogi, so označeni z rdečo barvo.

2.1.1.2 Morfološki opis reda kur (Galliformes) in sistematika na ravni družin

Za kure je značilno veliko in močno telo z razmeroma majhno glavo, ki jo nosi vrat srednje dolžine. Imajo močan zaokrožen kratek kljun, ki je na vrhu malo zavit. Imajo shizognatno nebo. Njihova prsnica je ozka in ima dobro razvita okna. Njihova krila so kratka in zaokrožena (Ognev, 1956). So slabi letalci, saj imajo težje kosti od večine drugih neognatnih ptic (Radovanović, 1965), zato so kure talne ptice, ki pa izvrstno tečejo (Škornik, 2006). Imajo dobro razvit rep in gosto perje. Kure v naravnem okolju ponavadi živijo v manjših skupinah. Pri večini vrst, ki imajo značilen spolni dimorfizem, je prisotna poligamija. Pri slednjih se samci od samic razlikujejo po telesni velikosti, obarvanosti perja, oglašanju in drugih znakih. Nekatere vrste so monogamne. Kure so večinoma stalne ptice (Škornik, 2006).

V red kur (Galliformes) sistematiki uvrščajo pet družin: poljske kure (Phasianidae), prepelice novega sveta (Odontophoridae), pegatke (Numididae), hokohojke (Cracidae) in velenoge kure (Megapodiidae) (Kriegs in sod., 2007).

2.1.1.3 Molekulska filogenija in opredelitev skupine Galliformes

Idealna začetna točka za ugotavljanje filogenetskih odnosov med galiformnimi pticami je domača kokoš (*Gallus gallus domesticus*), saj je znan celoten genom tega modelnega organizma (Kriegs in sod., 2007).

Odontophoridae, Numididae, Cracidae in Megapodidae so zunanje skupine družini Phasianidae. V njej so prepelice, fazani in jrebice polifiletske skupine. Zelo pomembna je ugotovitev, da kokoš predstavlja zunanjo skupino puranom in prepelicam (Kaiser in sod., 2007).

Filogenija galiformnih ptic, vključujoč kokoš, purana in prepelico ponavadi kaže kratke interne veje, ki odražajo hitro razvejitev teh ptic v obdobju eocena (Kaiser in sod., 2007).

Ob preučevanju nukleotidnih zaporedij gena za citokrom b so z analizami zaporedij z metodama največje varčnosti (angl. »maximum parsimony«) in največjega verjetja (angl. »maximum likelihood«) ugotovili sledeče filogenetske odnose znotraj družine Phasianidae: rod *Gallus* (sem sodi domača kokoš) se v vseh oblikah analize podatkov kaže kot predniški linijam preostalih poljskih kur (Phasianidae) in obenem kot sestrška skupina zunanji skupini Cracidae (hokohojke) (Bush in sod., 2003).

Analiza celotnih zaporedij za citokrom b prikaže med rodovi znotraj družine Phasianidae sledeče filogenetske odnose: kokoš (*Gallus*), pav (*Pavo*, *Afropavo*), jerebica (*Coturnix*, *Alectoris*) so med seboj sestrski. Pegatka (družina Numididae) je sestrka vsem preostalim rodovom družine poljskih kur (Phasianidae), pri čemer so kot zunanjo skupino uporabili družino Cracidae (hokohojke) (Kimball in sod., 1997).

Številni rodovi fazanov (*Crossoptilon*, *Syrnaticus*, *Phasianus*, *Chrysolophus*, *Catreus*, *Lophura*) dva rodova pavov (*Pavo*, *Afropavo*) ter preostali rodovi, ki jih tradicionalno uvrščajo v družino Phasianidae, so med seboj sestrške skupine.

Analiza primerjav mitohondrijskih kontrolnih regij DNA 16 vrst iz družine Phasianidae kaže znotraj rodov kokoši (*Gallus*), pavov (*Pavo*) ter fazanov (*Phasianus*, *Chrysolophus*, *Syrnaticus*, *Lophura*) sledečo filogenetsko sliko: kokoši in fazane uvršča skupaj kot sestrski skupini, medtem, ko pave oddalji kot sestrsko skupino obem preostalim rodovom kokoši in fazanov (Fumihito in sod., 1995).

2.1.1.4 Morfološke analize in podprtost skupin znotraj reda Galliformes

Študija 102 morfoloških značilnosti, od tega 89 osteoloških (Dyke in sod., 2003), obravnava red Galliformes (kure) kot monofiletsko skupino, če upoštevamo red Anseriformes (plovce). Megapodiidae (velenoge kure) so monofiletska skupina in obenem sestrka skupina redu Galliformes. Cracidae (hokohojke) so prav tako skupina monofiletskega izvora in obenem sestrka skupina družini Phasianidae (če izključimo družino Megapodiidae).

Z upoštevanjem Megapodiidae in Cracidae, tvorijo Phasianidae (poljske kure) monofiletsko skupino znotraj Galliformes.

Pegatke (Numididae) so znotraj reda Galliformes najbolj bazalni (osnovni) takson skupaj z družino Phasianidae, čeprav njihov monofiletski izvor ni značilno podprt na osnovi morfoloških značilnosti.

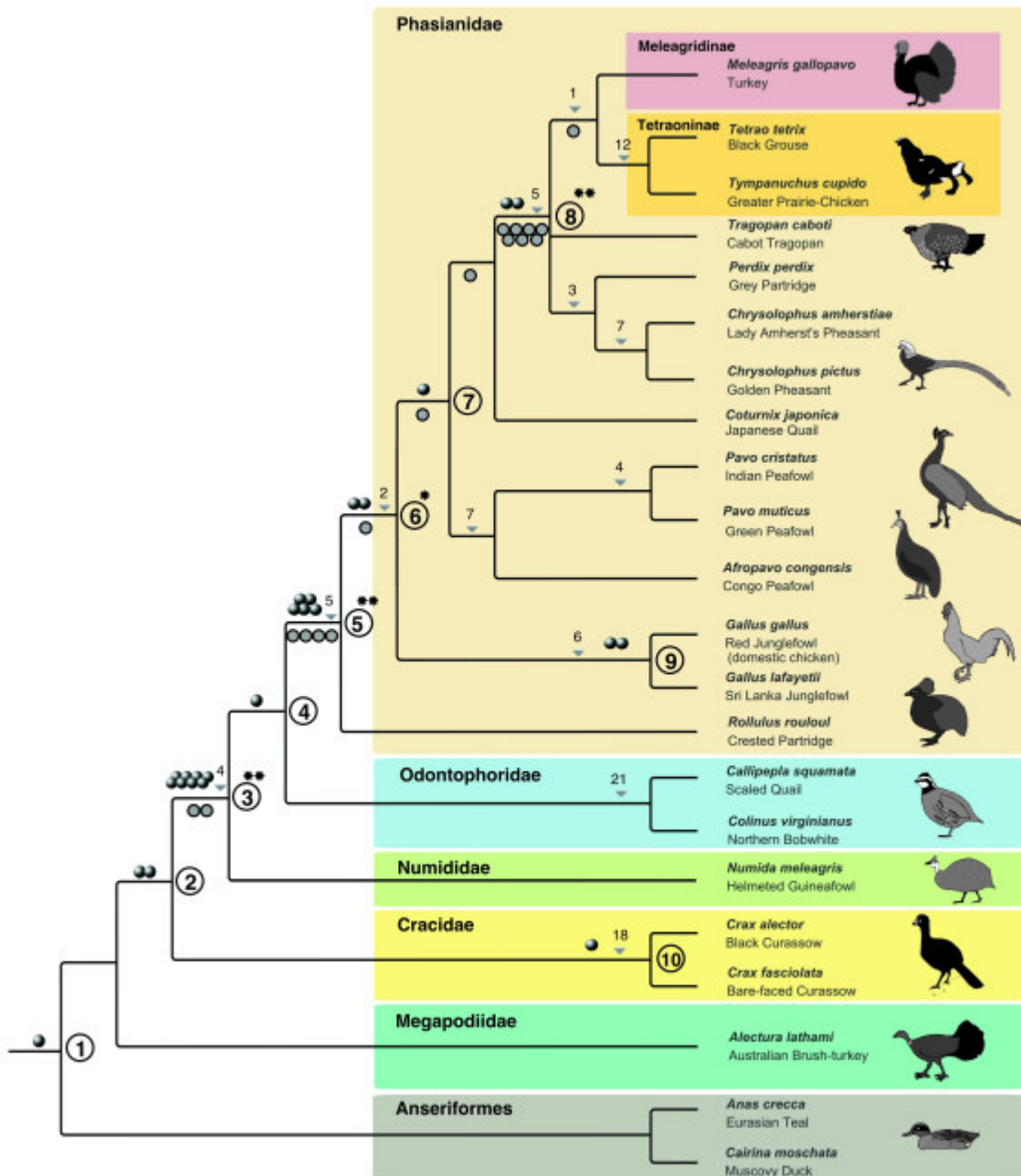
Prepelice starega in novega sveta (angl. »new and old world quails«), vključno z rodovoma jerebic (*Perdix*) in prepelic (*Coturnix*), tvorijo skupino monofiletskega izvora, če upoštevamo preostale rodove iz družine Phasianidae (pave, fazane, purane, kokoš).

Preostali rodovi redu Galliformes (vključno z divjim petelinom, prepelicami, fazani, purani, pavi, tragopani in frankolini) tvorijo številne manjše filogenetske veje, ki so med seboj zaporedne sestrške skupine, če upoštevamo prepelice.

Na osnovi morfoloških značilnosti lahko zaključimo, da so rodovi *Perdix*, *Meleagris*, *Phasianus* in *Gallus* sestrške skupine znotraj družine Phasianidae in reda Galliformes.

2.1.1.5 Molekularne študije filogenetskih odnosov znotraj družine Phasianidae

Poleg morfološke podprtosti ima družina Phasianidae tudi določeno molekularno filogenetsko podporo. Nedavna študija petih med seboj neodvisnih retrotranspozonskih insercij (Kriegs in sod., 2007) predstavlja značilno statistično dobro podprt monofiletski izvor rodov znotraj družine Phasianidae. Skupnega prednika so torej imeli naslednji predstavniki (v oklepaju naveden rod, kateremu pripadajo): pav (*Pavo*), afriški pav (*Afropavo*), prepelica (*Coturnix*), zlati in diamantni fazan (*Chrysolophus*), jrebica (*Perdix*), divji petelin, belka, skalni jereb in ruševac (*Tetrao*), puran (*Meleagris*) in tragopan (*Tragopan*).



Slika 2: Klasifikacija poljskih kur (Phasianidae) ter sestrskih družin znotraj reda kur (Galliformes).
 Red Galliformes skupaj z redom plovcev (Anseriformes) tvori medrazred (angl. <infraclass>) Galloanseriformes (Kriegs in sod., 2007). Molekulska študija je narejena na osnovi petih neodvisnih retrotranspozonov (CR1).

2.1.1.5.1 Molekulske študije Ig naddružine

Primerjava zaporedij regije, ki kodira interlevkin (IL)-1 β pri kokoši, puranu, gosi, raci ter golobu ne kaže dejanskih filogenetskih odnosov med naštetimi pticami, saj je aminokislinsko zaporedje kokoši bolj podobno račjemu (99%) in gosjemu (99%) kot pa puranjemu (94%). Vseeno pa je zaporedje za IL-1 β kokoši najbolj različno od golobjega (77%), kar pa ustreza filogenetski oddaljenosti reda golobov (Columbiformes) od nadreda Galloanseriformes, kateremu pripadajo preostale preučevane ptice. Ravno tako kaže primerjava aminokislinskega zaporedja za interlevkin (IL)-1 β kokoši v skladu s filogenetskimi odnosi, s sesalci znatno manjše ujemanje: z zaporedjem človeka in goveda (24%) (Yung in sod., 2007).

2.2 PROTITELESA- IMUNOGLOBULINI

2.2.1 Splošno o protitelesih

Protitelesa so veliki (okrog 150 kDa) globularni plazemski proteini, ki so znani tudi pod imenom imunoglobulini. Na določene aminokislinske ostanke imajo dodane sladkorne verige, strukturno so torej glikoproteini. Osnovna funkcionalna enota vsakega protitelesa je imunoglobulin (monomer), sekrecijska protitelesa pa so lahko tudi dimeri (z dvema Ig enotama), npr. IgA, tetrameri (s štirimi Ig enotami), npr. IgM rib kostnic ali pentameri s petimi enotami, npr. sesalski IgM.

Imunoglobulini imajo protitelesno aktivnost in so prisotni v krvi, limfi in prekrvljenih tkivih vseh čeljustnih vretenčarjev. Njihova osnovna struktura sestoji iz štirih polipeptidnih verig, dveh težkih verig (Tv) in dveh lahkih verig (Lv), ki skupaj tvorijo monomerno enoto (Tv₂Lv₂). Vsak razred imunoglobulinov lahko tvori membransko vezan ali topen antigenski receptor. IgG sestojijo iz osnovne enote, bolj kompleksne molekule, kot so npr. IgM in IgA, pa so sestavljene iz multiplih enot (Tv₂Lv₂)_n. Tv in Lv so sestavljene iz domen, ki so dolge okrog 115 aminokislin in imajo ohranjene cisteinske in triptofanske ostanke in znotrajdomenske disulfidne vezi, ki vzdržujejo funkcionalno pomembno terciarno strukturo. Tv in Lv združujejo znotrajveržne disulfidne vezi. Domene na amino terminalnem koncu obeh tipov verig (Tv in Lv) so zelo spremenljive, zato jih imenujemo variabilne (v) domene. Pari domen vTv (variabilne domene težkih verig) in vLv (variabilne domene lahkih verig) tvorijo mesto za vezavo antigena, ki daje protitelesu specifičnost (vsako protiteleso sestavljata dve Lv in dve Tv). Vezavno mesto za antigen se prilega epitopu iz 6-9 aminokislin ali

ogljikovih hidratov. Osnovna monomerna enota Ig ima dve vezavni mesti za antigen. Na konstantnih domenah lahkih verig (kLv) oziroma težkih verig je genska raznolikost majhna. V splošnem imajo Tv 2-4 konstantne regije in Lv eno samo kLv. Biološke značilnosti membranskega transporta so odvisne od konstantnih domen, kar vključuje sekundarne efektorske funkcije, kot sta fiksacija komplemента in opsonizacija (Davidson in sod., 2008).

Protitelesa v krvi, so del humoralnega imunskega sistema in osnovna obrambna komponenta adaptivnega imunskega sistema proti vdirajočim patogenim mikroorganizmom. Aktivirani limfociti B se diferencirajo v plazmatke (protitelesa proizvajajoče celice), ki izločajo topna protitelesa, ki specifično odgovorijo samo na en antigen ali pa v spominske celice, ki ostanejo v telesu več let in omogočajo imunskemu sistemu, da si zapomni antigen ter ob ponovni izpostavitvi antigenu omogoča hiter imunski odgovor (Roitt in sod., 1998).

Protitelesa prispevajo k imunosti na različne načine: patogenom preprečujejo vstop v celice in poškodovanje celic z vezavo patogena nanje, stimulirajo lahko odstranitev patogena z makrofagi in drugimi celicami z označenjem patogena ter sprožijo neposredno uničenje patogena s stimulacijo drugih imunskih odzivov, kot je npr. komplementni sistem (Paul, 2003).

Poleg topne oblike protiteles, ki se izločijo v kri in druge telesne tekočine, poznamo tudi membransko vezano obliko, ki se pripne na površino limfocitov B.

2.2.2 Podenote protiteles

Glede na funkcije in biokemijske lastnosti ločimo dve podenoti protiteles: Fab-podenoto, ki je odgovorna za vezavo antigena, in Fc-podenoto, ki ima vlogo moduliranja celične aktivnosti, vključuje: fiksacijo komplemента (posledica je liza celic in sproščanje biološko aktivnih molekul), vezavo na različne celične tipe: fagocite, limfocite, trombocite, mastocite, bazofilce (Paul, 2003).

Posledica razgradnje s papainom je razpad Ig molekule na fragmenta Fab (angl. »Fragment antigen binding«) in Fc (angl. »Fragment crystallize«). Če kokošje IgG tretiramo s papainom, molekula razpade na regiji F(ab')₂ in Fc, ki je brez k₂Tv dela. Slednji je glikoziliran, končni sladkor je sialična kislina (Suzuki in Lee, 2004b). Prav tako je glikoziliran Fc del (domeni k₃Tv in k₄Tv) in ima veliko količino manoze. Če molekulo sesalskega IgG tretiramo s

pepsinom, dobimo divalent $F(ab')_2$, Fc regija pa se razgradi na majhne peptide (Roitt in sod., 1998).

Fab: Ig molekula razpade pred vodikovo medverižno disulfidno vezjo, rezultat razgradnje sta dva identična fragmenta, ki vsebujeta Lv in vTv ter kTv. Ker Ig vsebuje posebno kombinacijo vTv in vLv (antigensko determinanto), je zmožen vezave na specifične antigene. Paratop je oblikovan na aminoterminalnem koncu protitelesa, sestoji pa iz variabilnih domen Tv in Lv (Roitt in sod., 1998).

Fc: je fragment, ki vsebuje preostanek dveh Tv, od katerih pri sesalcih vsaka vsebuje k_2Tv in k_3Tv domeno (odvisno od tipa razreda protitelesa) (Roitt in sod., 1998). Podenota Fc ima vlogo moduliranja imunske celične aktivnosti, z vezavo na specifične proteine zagotavlja primeren imunski odgovor za določen antigen. Podenota Fc se veže na različne celične receptorje, kot so Fc receptorji in druge imunske molekule, npr. so proteini komplemента. S tem posreduje različne fiziološke vplive, vključujoč opsonizacijo, lizo celic, degranulacijo mastocit, bazofilcev in eozinofilcev (Heyman, 1996).

$F(ab')_2$: Tv se cepijo po vodikovi vezi, ki povezuje verigi (disulfidne vezi). Fragment $F(ab')_2$ je divalent in vsebuje obe vezavni mesti za antigen (Roitt in sod., 1998).

2.2.3 Pregled razredov protiteles

Protitelesa delimo, glede na njihovo strukturo in funkcijo, na več razredov. Pri tem se pri posameznih vretenčarskih razredih pojavlja več različnih razredov protiteles. Nekateri razredi protiteles se pojavljajo v več vretenčarskih razredih. V splošnem je značilno, da so različni razredi protiteles pri različnih vretenčarskih razredih filogenetsko povezani z razredi znotraj drugih vretenčarskih skupin. Protitelesa IgM so evlucijski prednik IgA ter IgG (IgY) ptic, iz katerih so se razvili sesalski IgE ter IgG (Honjo in sod., 2004).

Protitelesa danega razreda definira tip težke verige. Težke verige pri sesalcih so: α za IgA, ϵ za IgE, δ za IgD, γ za IgG in μ za IgM. Poleg para težkih verig pa tvori sesalsko protitelo tudi par lahkih verig, ki so bodisi tipa κ ali tipa λ . Protitelesa IgG ptic gradi par težkih verig v in par lahkih verig λ (Grant in sod., 1971).

Preglednica 1: Različni izotipi protiteles vretenčarjev (povzeto po: Honjo in sod., 2004).

Skupina vretenčarjev	Razredi Ig
Sesalci	IgM, IgD, IgG, IgE, IgA
Ptice	IgM, (dve obliki IgG): IgG (IgY) in IgY (Δ Fc), IgA
Plazilci	IgM, IgY (dve obliki IgY)
Dvoživke	IgM, IgY, IgX (dve obliki IgY)
Ribe kostnice	IgM, IgD- podobna, dve obliki IgW (samo ribe pljučarice)
Ribe hrustančnice	IgM, IgM _(g) , IgW (dve obliki), IgNAR

2.2.4 Razredi protiteles ptic

V 300 milijonih let, odkar sta se ločili filogenetski liniji sesalcev in ptic, so se zgodile številne spremembe v evoluciji protitelesnega odziva ptic in sesalcev (Tizard, 2002).

Pri kokoših in puranih so identificirali tri razrede Ig, ki so imunokemijsko in genetsko homologni sesalskim IgM, IgA in IgG (Ratcliffe, 2006).

Kokošji IgM so strukturno in funkcionalno homologni sesalskim, prisotni so v serumu kot pentameri iz μ_2L_2 podenot in so prvi razred protiteles, ki se tvori tekom primarnega protitelesnega odziva. IgM so prevladujoč razred Ig, izražen na površini kokošjih limfocitov B (Ratcliffe, 2006).

Razred ptičjih IgG-protiteles je s filogenetske perspektive enako oddaljen od sesalskih IgG in IgE in ga pri pticah mnogokrat imenujejo IgY. V nalogi bom omenjen razred poimenovala IgG.

Protitelesa IgG so med protitelesi ptic najboljše preučena. Funkcionalno se tvorijo predvsem v sekundarnem protitelesnem odzivu (Ratcliffe, 2006).

Kokošji IgA so v serumu in izločkih, npr. žolču, prav tako kot sesalski homologi. Kaže, da ni kokošnjega homologa sesalskim IgD. Prav tako pri kokoših ni razreda IgE, pri čemer je treba poudariti, da nekatere funkcije sesalskih IgE prevzemajo kokošji IgG (Ratcliffe, 2006).

Do danes so bile študije negaliformnih ptic pretežno omejene na golobe (IgG, IgA in IgM), race in gosi. Race in gosi poleg normalne oblike IgY (IgG) izražajo alternativno obliko gena za IgY težke verige: IgY (ΔFc), ki nima Fc regije (tretje in četrte domene Tv) ter z njo povezanih sekundarnih efektorskih funkcij (Lundqvist, 2005).

Preglednica 2: Razredi kokošnjih Ig in njihove lastnosti (Ratcliffe, 2006).

Lastnosti protiteles	IgM	IgG	IgA
Molekulska masa	~940 kDa	175 kDa	130 kDa v serumu 350 kDa v žolču 700 kDa v drugih izločkih
Normalna koncentracija v serumu	1.3 mg/ml	5.0 mg/ml	0.3 mg/ml v serumu 2-3 mg/ml v žolču
Struktura	$\mu_{10}L_{10}+J$ veriga	μ_2L_2	α_2L_2 v serumu α_4L_4+J veriga v žolču α_8L_8+J veriga v drugih izločkih
Struktura težke verige	70 kDa 5 domen ($V_H-C\mu 1-4$)	67 kDa 5 domen ($V_H-C\gamma 1-4$)	65 kDa 5 domen ($V_H-C\alpha 1-4$)
Podobnost humani težki verigi	33% podobna humani μ verigi	31-32% podobna humani γ in ϵ verigi	35% podobna humani α verigi
Struktura lahke verige	22 kDa 2 domeni (V_L-C_L)		

2.2.5 Funkcije protiteles pri pticah

Glavne funkcije protiteles v imunskem odzivu so nevtralizacija antigenov, opsonizacija antigenov in olajšanje njihove fagocitoze, aglutinacija antigenov in aktivacija (fiksacija) komplementnega sistema. Protitelesa IgG se vežejo na mikroorganizme (npr. bakterije) in blokirajo njihovo vezanje na celične receptorje gostitelja. Vezava protitelesa lahko nadalje sproži uničenje patogena preko fagocitoze. Sledi kratek opis različnih razredov Ig ptic.

IgM se izraža na površju limfocitov B in sodeluje pri primarnem imunskem odzivu.

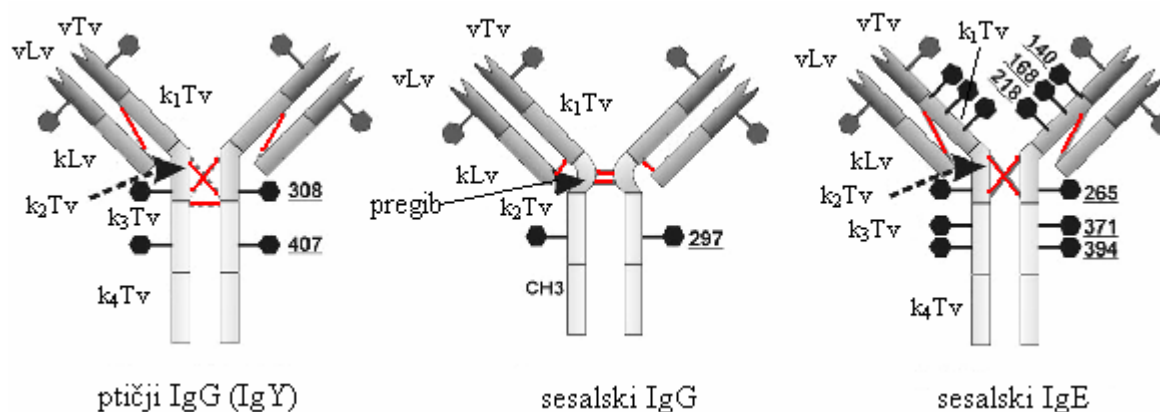
Razred protiteles IgG ptic je prednik sesalskih IgG in IgE in kot tak združuje funkcije obojih. Kot sesalski homolog IgG je tudi IgG pri pticah prevladujoče sistemsko protitelo, udeleženo pri fiksaciji komplementa in opsonizaciji. Preko jajčnega rumenjaka se prenese z matere na razvijajoči se zarodek. Kot sesalski homolog IgE je IgG pri pticah protitelo, ki senzibilizira (je tkivno občutljivo) in je lahko udeleženo pri anafilaksiji (Lundqvist in sod., 2006).

IgA ima obrambno funkcijo na površinah telesa, ki so izpostavljene zunanjim vplivom. Do sedaj je bilo opisano samo pri pticah in sesalcih. Najdemo ga v izločkih črevesja,

respiratornega in reproduktivnega trakta, jajčnem beljaku, žolču, v alantoisni in amnionski tekočini (Benčina in sod., 2005) ter mleku in solzah (pri sesalcih).

2.2.6 Struktura kokošjih IgG

Molekula IgG ima molekulsko maso 170 kDa in je sestavljena iz dveh težkih (ν) (ipsilon) z molekulsko maso 65 kDa in dveh lahkih (λ) verig z molekulsko maso 20 kDa. Konstantne regije (k) kokošjih IgG in IgG primatov so homologne, to je vidno na domenah $k_3\nu$ in $k_4\nu$ verige ν in $k_2\gamma$ in $k_3\gamma$ verige γ .



Slika 3: Primerjava strukture ptičjih IgG, sesalskih IgG ter IgE (Suzuki in Lee, 2004b).

Rdeča barva označuje lego disulfidnih vezi, šestkotniki označujejo mesta N-glikozilacije. vLv- variabilna regija na lahki verigi, kLv- konstantna regija na lahki verigi, vTv- variabilna regija na težki verigi, kTv- konstantna regija na težki verigi.

Tv ν ima eno variabilno (v) in štiri konstantne (k) regije. Za Tv molekule IgG so značilne številne disulfidne vezi, ki povezujejo dele znotraj Tv (intradomenske), dele obeh Tv (interdomenske) ter dele Tv in Lv. Veriga ν ima dodatno intradomensko disulfidno vez v regiji $k_1\nu$ v primerjavi s sesalskimi IgG in IgE.

V verigi γ IgG primatov ni domene, ki bi funkcionalno ustrezala domeni $k_2\nu$ težke verige (Warr in sod., 1995). Pri razvoju IgG iz predniške molekule IgG je najverjetneje prišlo do preoblikovanja domene $k_2\nu$ v pregibno regijo v IgG, saj sta na 3' koncu eksona $k_2\nu$ zapisa za kokošje Ig kodona za aminokislini cistein in prolin, ki ju najdemo na karboksiterminalnem delu pregibnih regij različnih razredov Ig različnih organizmov (Magor in sod., 1994b). Kokošji Ig nimajo preklopne regije, ki je tipična za Ig sesalcev. Delno pregibnost Ig pri kokošjih IgG omogočata aminokislini prolin in glicin na mejah regij $k_1\nu$ in $k_2\nu$ ter $k_2\nu$ in $k_3\nu$ (Warr in sod., 1995).

Pri sesalskih IgG sta dve Tv (γ) in dve Lv (κ ali λ) verigi medsebojno povezani z disulfidnimi vezmi in vrsto nekovalentnih vezi. Slednje ohranjajo strukturo IgG tudi po cepitvi disulfidnih vezi.

Kokošji IgG imajo funkcijo sesalskih IgG, vendar obstaja med njima strukturna razlika v težki verigi in v položaju ter številu disulfidnih vezi.

V primerjavi s sesalskimi IgG imajo IgG ptic drugačno pregibno regijo ter dodatno domeno v konstantni regiji Tv (Slika 3). Domeni k_3Tv in k_4Tv IgG ptic ustrezata domenama k_2Tv in k_3Tv protiteles razreda IgG. Domena k_2Tv protiteles razreda IgG ptic, ki je pri sesalskih IgG ni najti, je tekom evolucije kondenzirala v pregibno regijo pri sesalskih IgG (Warr in sod., 1995).

Organizaciji znotrajdomenskih in medveržnih disulfidnih povezav ter mesta N-glikozilacije IgG ptic ter IgE sta si zelo podobni (Slika 3) (bolj kot vzorca N-glikozilacije IgG ptic ter IgG sesalcev), strukturno so torej protitelesa IgG ptic bolj kot IgG podobna sesalskim IgE. Kokošji in račji IgG imajo dve potencialni mesti za N-glikozilacijo. Prvo leži na domeni k_2Tv (pri kokoši je to 308. aminokislina: N), drugo pa na domeni k_3Tv IgG. Kot sladkorna komponenta na domeni k_2Tv ter delu Fab IgG je prisoten kompleksen N-glikan, na domeni k_3Tv (pri kokoši je to 407. aminokislina: N) pa oligosaharid z veliko količino manoze (Suzuki in Lee, 2004b) (Slika 3).

Znanstveniki domnevajo, da so se geni za Tv γ in ϵ razvili s podvojitvijo genov, IgG ptic naj bi bil prednik tako IgG kot IgE (Warr in sod., 1995) pri sesalcih.

Ker je imunski sistem pri pticah poleg kokoši najboljše raziskan pri racah, bom v nadaljevanju opisala nekaj značilnosti protiteles in imunskega sistema pri racah.

2.2.7 Posebnost IgG (IgY) pri racah in genetsko ozadje

Race imajo za razliko od kokoši limfne vozle, sicer pa imajo enaka hematopoetska tkiva, vključujoč kostni mozeg, vranico, timus in Fabricijevo burzo (Lundqvist in sod., 2006).

Race izražajo tri oblike IgG: a) izločeno obliko s štirimi domenami C, b) receptorsko obliko, ki ima C-terminalni del povezan z membrano, c) okrnjeno obliko IgY(Δ Fc), ki ima samo dve konstantni (k) regiji (Lundqvist in sod., 2006).

Slednjo obliko najdemo tudi pri goseh. Značilnost tega protitelesa je alternativna oblika IgY (IgG) Iv IgY(Δ Fc), ki nima Fc-regije in z njo povezanih sekundarnih funkcij in je strukturni ekvivalent F(ab')_2 -fragmenta. Težko verigo imenujemo ν (Δ Fc) in je zapisana z istim genom kot ν , kar pomeni, da sta IgY in IgY(Δ Fc) izoformi istega razreda Ig (Warr in sod., 1995). Molekulska masa težke verige ν (Δ Fc) je 37-42 kDa, saj ne vsebuje dveh konstantnih regij ($\text{k}_3\nu$ in $\text{k}_4\nu$) (Bando in Higgins, 1996). Molekulska masa celotnega IgY(Δ Fc) znaša 120 kDa. Ker nima domene Fc, ima takšna skrajšana oblika IgY potencialne lastnosti za uporabo v imunskih testih in drugih imunoloških aplikacijah (Chiou, 2002). V račjem serumu je približno razmerje $\text{IgY}:\text{IgY}(\Delta\text{Fc}) = 3:5$. Za IgY(Δ Fc) velja, da prevladuje kasneje v imunskem sistemu in se prav tako kot IgY prenaša na zarodek preko rumenjaka (Lundqvist in sod., 2006).

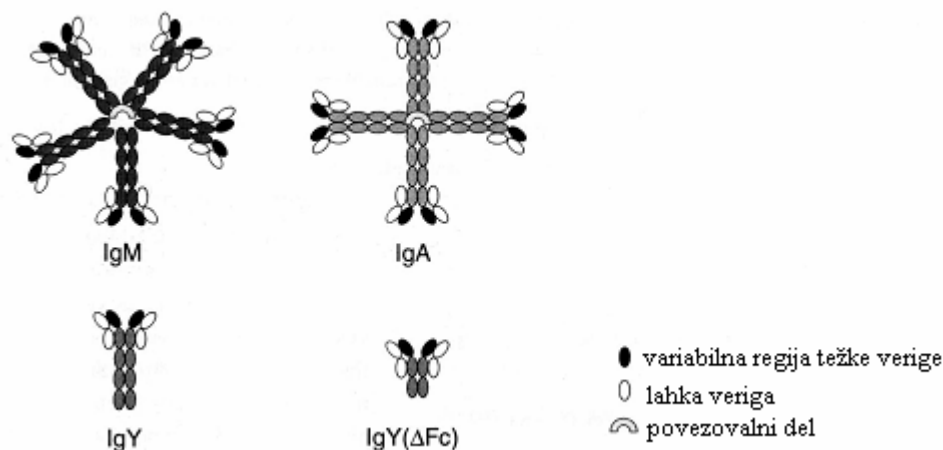
Okrnjeno obliko IgY so našli tudi pri ribah (pljučaricah) ter plazilcih (želvah). Sistematske študije imunoglobulinov ptic še niso bile izvedene, predvidevajo pa, da izražanje IgY(Δ Fc) pri pticah ni omejeno samo na race in gosi (Ludqvist in sod., 2006).

Funkcija okrnjenih protiteles IgY še ni znana, verjetno sodelujejo pri nevtralizaciji antigenov. Zaradi odsotnosti regije Fc pa ne morejo sodelovati v sekundarnih bioloških efektorskih funkcijah, kot so precipitacija, aglutinacija, fiksacija komplemента in opsonizacija (Lundqvist in sod., 2006).

Prav tako ni znano, ali je organizacija lokusa težke verige, ki je prisotna prav tako pri kokoših in ima organizacijo genov: μ , α in ν z inverzijo α na lokusu, značilna samo za galoanseriformne ptice.

Race, imajo tako kot kokoši eno samo imunoglobulinsko lahko verigo tipa λ (Ludqvist in sod., 2006). Račja protitelesa IgM krožijo po telesu in imajo pentamerno obliko z molekulska

maso približno 800 kDa, s težkimi verigami velikosti 86 kDa, lahkimi pa 23-25 kDa. V žolču imajo rase IgA polimerne oblike (tetramer) z molekulsko maso 890 kDa (Ludqvist in sod., 2006).



Slika 4: Shematski prikaz strukture različnih protiteles.

Polimerne strukture IgM in IgA so bile določene posredno (Ludqvist, 2006).

2.2.7.1 Genetsko ozadje okrnjene oblike IgG (IgY) pri racah

Obstaja en gen ν in konstantne regije treh izooblik, ki jih kodira 7 eksonov. Z različnimi načini rezanja in oblikovanja se prepiše v tri različne težke verige: verigi ν in $\nu(\Delta Fc)$, ki se izločita iz celice, in ν membransko vezano obliko težke verige (=transmembranska oblika težke verige IgY, νTM) (Vozelj, 1985).

Aminokislinsko zaporedje hidrofobnih transmembranskih regij ν , γ in ϵ je zelo ohranjeno (Magor in sod., 1992). Vzorec oblikovanja transmembranskih težkih verig ν , γ in ϵ je drugačen od vzorca za μ in α . To potrjuje teorijo, da so IgY evolucijski predniki IgG in IgE (Vozelj, 1985). Prav tako so si aminokislinska zaporedja zapisov za težke verige ν , γ in ϵ zelo podobna, kar tudi potrjuje njihovo bližnjo sorodnost (Warr in sod., 1995).

Dejstvo, da dvoživke sintetizirajo samo IgY, kaže na to, da se je morala molekula IgY(ΔFc) v evoluciji večkrat pojaviti (Magor in sod., 1992).

Race ustvarjajo raznolik Ig repertoar z gensko konverzijo, tako kot kokoši (Ludqvist in sod., 2006).

2.2.8 Vzorci glikozilacije Ig ptic

Avtorji študije (Suzuki in sod., 2004a) vzorcev glikozilacije na glikoproteinih mnogih ptic različnih rodov paleognatnih ter neognatnih ptic ugotavljajo, da je izražanje galabioze (Gal α 1-4Gal) med pticami pogosto in da korelira s filogenijo.

Nobena izmed ptic, pripadajočih paleognatnim in galoanserinim (race in kokoši s sorodniki) (linije so se ločile pred okrog 100-65 milijonov let) pticam ne izraža Gal α 1-4Gal na glikoproteinih jajčnega beljaka, medtem ko večina preostalih rodov, pripadajočih t.i. skupini Neoaves izraža Gal α 1-4Gal (pri nekaterih vrstah se je ta lastnost v času evolucije izgubila).

Pri glikoproteinih (izoliranih iz jajčnega beljaka) skoraj vseh vrst ptic, so našli dokaz za β -galaktozilirane glikane, Gal β 1-4GlcNAc, ki so bili že prej znani za glikoproteine kokoši, japonske prepelice (*Coturnix japonica*), race mlakarice (*Anas platyrhynchos*) ter goloba (*Columba livia*) (Suzuki in sod., 2004a).

Serumski IgG goloba ima edinstvene značilnosti N- glikanov. Strukturne lastnosti kompleksnih (sestavljenih) N- glikanov kokošjega serumskega IgG so bolj podobne humanim IgG kot serumskemu IgG goloba, saj niso odkrili triantenarnih ali iztegnjenih vej z β ali α -galaktozilacijo (Suzuki, 2004b).

2.2.9 LAHKE IN TEŽKE VERIGE IMUNOGLOBULINSKIH MOLEKUL

2.2.9.1 Lahke verige imunoglobulinskih molekul vretenčarjev

Lahka veriga je majhna polipeptidna enota protitelesa, velika okrog 22-24 kDa. Večino protiteles (monomer) gradita dve istovetni lahki verigi, ki sta z disulfidnimi vezmi vezani na dve istovetni težki verigi.

Vsaka lahka veriga je sestavljena iz tandema Ig-domen: N- terminalne, variabilne regije, ki je del vezišča za antigen in C- terminalne konstantne regije, ki ni variabilna (Vozelj, 1996).

Gene za Ig lahke verige tetrapodov lahko razporedimo v štiri različne skupine: kappa (κ), lambda (λ), sigma (σ) in iota (ι). Nekateri razredi vretenčarjev so tekom evolucije izgubili določen tip lahke verige, tako imajo morski psi samo Lv tipa λ , podobno se pojavlja samo en tip Lv (κ) pri dvoživkah, plazilci so izgubili tip σ , ptice pa imajo samo tip λ lahke verige (Grant in sod., 1971).

Pri kokoših, puranih, racah in golobih so našli samo lahke verige, ki so homologne tipu λ sesalskih lahkih verig (Honjo in sod., 2004).

Za razliko od ptic imajo glodalci in primati dva tipa lahkih verig: κ (kapa) in λ (lambda), ki ju kodirata različna lokusa. Dva ločena lokusa sta nastala kot posledica genske duplikacije zgodaj v filogenetski preteklosti imunskega sistema, njuna podobnost v aminokislinskem zaporedju je posledično le 35%. Določeni edinstveni motivi zaporedij Lv so prisotni le v λ , ne pa v κ lahkih verigah višjih vretenčarjev. Primer je heksapeptidno zaporedje Ala-Thr-Leu-Val-Cys-Leu, ki je ohranjeno na konstantnem delu Lv λ Ig vseh vretenčarjev (Greenberg in sod., 1993).

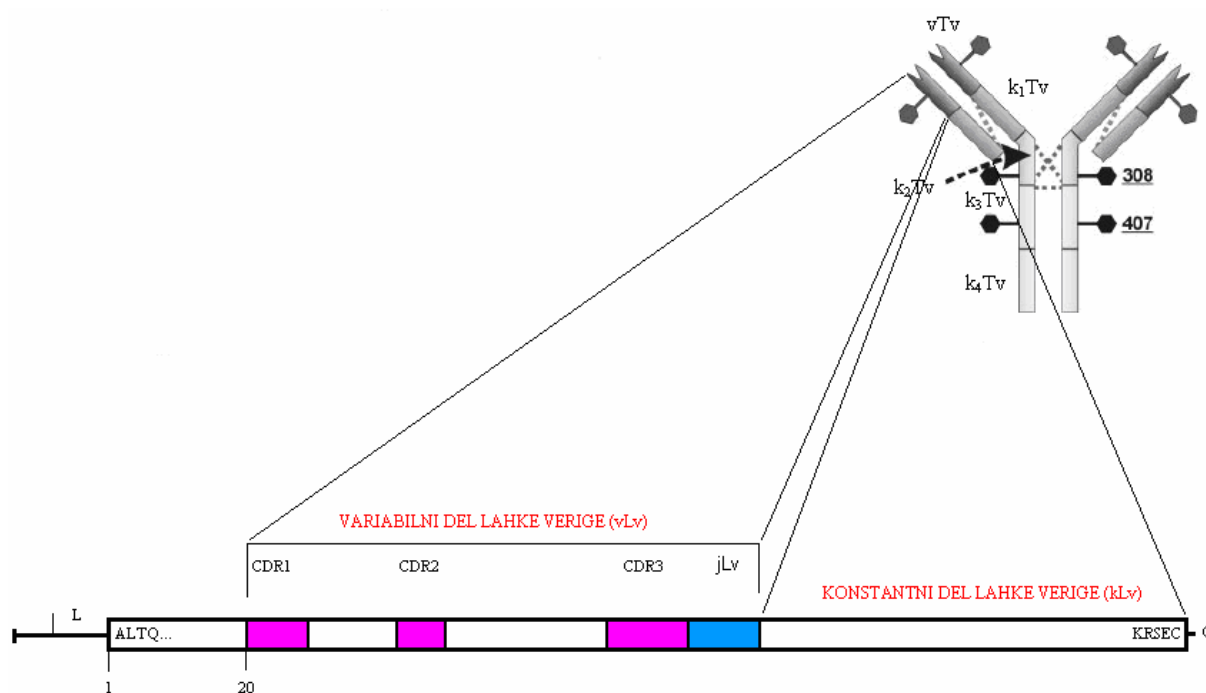
Različne vrste sesalcev imajo različna razmerja κ : λ , pri človeku je slednje: 65:35. Izjemo med sesalci predstavljajo kamele (Camelidae): saj njihova protitelesa nimajo lahkih verig, imajo samo težke verige, le-tem pa manjka ena C-domena (Honjo in sod., 2004).

Analiza žabjih Lv κ potrjuje domnevo, da so se λ Lv v evoluciji manj spremenile od κ Lv (Greenberg in sod., 1993).

Primerjava DNA zaporedij za Lv tipa λ med različnimi razredi vretenčarjev kaže na približno 40% podobnost med zaporedji ribe (morskega psa), sesalcev (miši) ter ptic (kokoši) (Greenberg in sod., 1993).

2.2.9.2 Lahke verige kokošjih Ig

Pri kokoših je le en tip Lv in ta ustreza tipu λ . N- terminalno aminokislinsko zaporedje Lv in delna zaporedja jLv in kLv so objavili Grant in sod. že leta 1970. Kasneje je bilo določeno celotno zaporedje sestavljene Lv kokoši (Reynaud in sod., 1983). Zaporedje se deli na variabilni del (vLv), jLv in kLv, skupno obsega 206 aminokislin. Vendar pa dolžina Lv variira zaradi različnega števila aminokislinskih ostankov v CDR1 in CDR3 (Parvari in sod., 1987; 1990).



Slika 5: Struktura kokošje Lv.

L- vodilno zaporedje (leader), CDR1- prvi del komplementarne determinante (število in zaporedje aminokislin variira za 7-10, CDR2- drugi del komplementarne determinante (število in zaporedje aminokislin variira), CDR3- tretji del komplementarne determinante (število in zaporedje aminokislin variira) (Parvari in sod., 1989, 1990), jLv- združevalni (joining) del Lv. kLv- konstantni del Lv ~ ak 104-206 (glede na objavljeno zaporedje Reynaud in sod., 1983).

2.2.9.3 Organizacija Ig genov pri kokoši

Čeprav lokusi težkih in lahkih verig pri kokoših vsebujejo multiple V- in (D)-segmente in le en sam J-genski segment, se lokusi razlikujejo od drugih vrst po tem, da je samo en V- in J-genski segment funkcionalen (Honjo in sod., 2004).

2.2.9.3.1 Lokus za težke verige

V času pisanja lokus za težke verige (Tv) pri kokoših še ni bil mapiran in sestavljen (Davidson in sod., 2008).

Edini funkcionalni variabilni (v)-segment težke verige v_1Tv leži približno 30 kb nad k_μ -lokusom in 15 kb nad enojnim jTv genskim segmentom. Segment v ima enake lastnosti kot mišji segmenti v: promotor z oktamerno sekvenco, vodilni peptid, vodilni intron in rekombinacijske signalne sekvence. Mnogi segmenti v pri kokoši so si med seboj zelo podobni, nekateri kodirajo iste aminokisljine, zato kljub prisotnosti različnih dTv elementov geni $vdjTv$, ki so nastali s preurejanjem, kažejo manjšo raznolikost kot geni $vdjTv$ pri miši ali človeku. Kljub tej veliki omejitvi imajo kokoši širok nabor protitelesnega odgovora in proizvajajo po zaporedjih raznolike protitelesne molekule (Roitt in sod., 1998).

80 do 100 vTv psevdogenov leži v regiji, približno 60 do 80 kb pred regijo v_1Tv . Psevdogeni vTv nimajo rekombinacijskih signalov, promotorskih in vodilnih zaporedij, njihov 3'-konec pa je spojen s segmentom, podobnim segmentu d, bistvene razlike so le v hipervariabilnih regijah. Te strukturne značilnosti omogočajo raznolikost genov vdj . Kot na $v\lambda$ -lokusu, ležijo vTv psevdogeni v nasprotni orientaciji glede na smer transkripcije, pri čemer imajo geni v_1Tv , ki so med vTv geni, enako orientacijo kot geni v_1Tv (Honjo in sod., 2004).

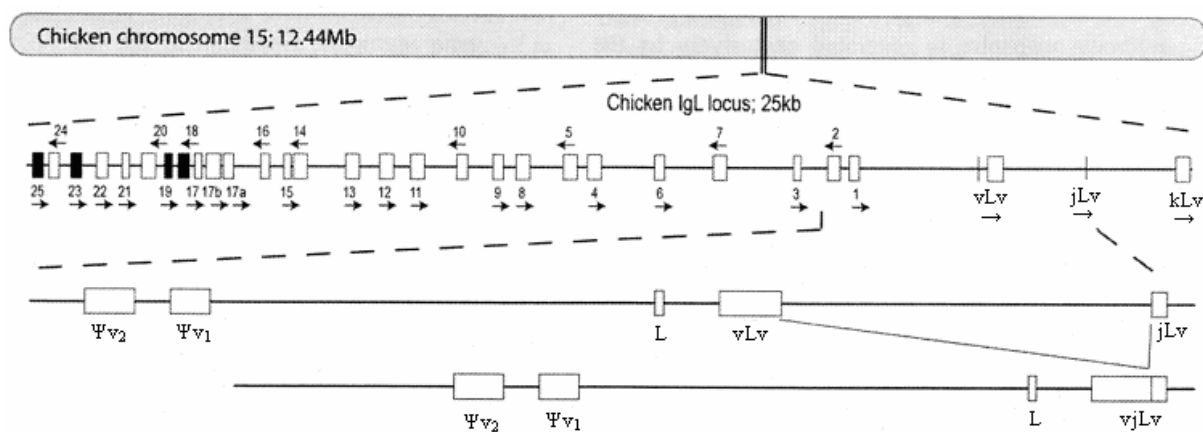
V zapisu se pojavljajo trije izotipi konstantne regije težke verige: IgM, IgG in IgA (Honjo in sod., 2004). Trije kTv geni v sledečem vrstnem redu: k_μ , k_α in k_ν (ali k_γ), ki kodirajo k regijo protiteles IgM, IgA in IgG, so prisotni na zgoščeni regiji (67 kb). Značilnost lokusa težke verige kokoši in rac je transkripcijska orientacija gena k_α , ki je ravno obrnjena glede na k_μ in k_ν . Za preklap predhodnega IgM izotipa v IgA se mora velik segment DNA, ki vsebuje k_μ in k_α gene obrniti (inverzija) (Honjo in sod., 2004).

2.2.9.3.2 Lokus za lahko verigo

Pri kokoših je prisoten samo en lokus lahke verige. Lokus (Slika 6) je bil pred kratkim določen in leži na kromosomu 15 (Ratcliffe, 2006).

Kokošji lokus za lahko verigo λ ima za razliko od sesalcev edinstvene kL_v , jL_v in vL_v genske segmente. Pred funkcionalnimi vL_v geni leži genska družina približno 25 psevdogenov ΨvL_v . Te so definirali kot psevdogene na osnovi dejstva, da nimajo signalnih rekombinacijskih sekvenc (RSSs), prav tako pogosto nimajo 5' in/ali 3' koncev in promotorskih sekvenc, potrebnih za transkripcijo. Psevdogeni ležijo v obeh transkripcijskih orientacijah glede na $v_1\lambda$ (Honjo in sod., 2004).

Enojni funkcionalni genski segment v lahke verige $v_1\lambda$ leži 1.8 kb pred enojnim $j\lambda$ genskim segmentom in približno 3.6 kb pred enojnim kL_v lokusom (Honjo in sod., 2004; GenBank M24403 McCormack in sod., 1989).



Slika 6: Organizacija lokusa lahke verige Ig pri kokoših (Ratcliffe, 2006).

$\Psi v_2, \Psi v_1$ - psevdogen, L- vodilno zaporedje (leader), vL_v - variabilni del lahke verige, jL_v - združevalni del lahke verige (joining).

Celoten lokus zavzema 25 kb, kar predstavlja majhen del v primerjavi z lokusom lahke verige pri glodalcih ali primatih (Ratcliffe, 2006).

2.2.9.3.3 Preurejanje genov za Ig pri kokoših

Pri višjih vretenčarjih se preurejanje Ig genov, razvoj limfocitov B in tvorba primarnega protitelesnega nabora pojavlja v mnogih oblikah. Pri miši in človeku se to odvija pretežno v kostnem mozgu, medtem ko se pri pticah limfociti B diferencirajo v Fabricijeve burzi. To je izvihek na dorzalni strani kloake (reproduktivnega, urinarnega in prebavnega organa pri pticah), sestavljen iz preprostega stebričastega epidermisa in rahlega povezovalnega tkiva z veliko krvnimi žilami in limfnimi folikli. Limfociti B se primarno tvorijo v zarodkovih jetrih, rumenjaki vrečki in kostnem mozgu, potem potujejo po krvi do Fabricijeve burze (Ratcliffe, 2006).

Po izvalitvi pridejo antigeni iz črevesja v burzo. Razvoj burze poteka tekom embrionalnega razvoja v odsotnosti zunanjih antigenov, razvoj kokošjih limfocitov B pa poteka po izvalitvi-vpliv na to ima lahko prisotnost okoljskih antigenov (Ratcliffe, 2006). Po izvalitvi so burzalne celice izpostavljene okoljskim antigenom v lumnu burze (Arakawa in Buerstedde, 2003).

Pri kokoših se limfopoeza B pojavlja v zgodnjem razvoju in se kasneje v življenju ne nadaljuje (Honjo in sod., 2004). Ko limfociti B znotraj burze dozori, migrirajo v druga tkiva: kri, vranico, bezgavke, kostni mozeg, Harderjevo žlezo in timus.

Burza sestoji iz približno 10 000 limfoidnih foliklov. Vsak folikel ima majhno število preburzalnih zarodnih celic v katerih se v znotrajzarodnem mezenhimu dogaja posamezno preurejanje Ig genov (Arakawa in Buerstedde, 2003).

V Fabricijeve burzi preživi le 5% vseh limfocitov B in oblikuje populacijo zrelih limfocitov B, ki so se sposobni odzvati na antigen. Čeprav mikrookolje Fabricijeve burze ni potrebno za preurejanje in ekspresijo Ig, pa predstavlja osnovni pogoj za tvorbo raznolikosti protiteles z gensko konverzijo (Ratcliffe, 2006). Pred 6-imi meseci starosti se začne Fabricijeva burza krčiti in izgubi omenjeno funkcijo (Pastoret in sod., 1998).

2.2.9.3.4 Mehanizem somatske genske konverzije pri kokoših

Za razliko od sesalcev, kjer kombinacije preureditev multiplih v , (d) in j genskih segmentov tvorijo veliko število edinstvenih težkih in lahkih verig Ig, kokoši uporabljajo iste $v_1\lambda$, $j\lambda$, v_1Tv in jTv genske segmente za preurejanje lokusov lahke in težke verige Ig (Honjo in sod., 2004).

Prav tako za razliko od glodalcev in primatov, pri katerih se primarni protitelesni nabor tvori izključno v procesu preurejanja, se pri kokoših tvori v procesu somatske genske konverzije. V omenjenem procesu se na lokusu višje ležeči psevdogeni V vključijo v preurejene segmente v_j in v_{dj} genov (Reynaud in sod., 1985, 1985; Thompson in Neiman, 1987). Pri tem ostajajo psevdogeni V nespremenjeni. Čeprav so zaporedja $v\lambda$ psevdogenov homologna $v_1\lambda$, se od njih razlikujejo v in okoli CDR regij, ki prispevajo k raznolikosti dela Fab protitelesa, ki je pomemben za vezavo antigena (McCormack in sod., 1989).

Vključevanje psevdogenov je odvisno od slednjih dejavnikov: podobnosti zaporedij, transkripcijske orientacije in razdalje od preurejenega genskega segmenta v (McCormack in sod., 1993). Na vsakem preurejenem v_j in v_{dj} genu se lahko dogodi več dogodkov genske konverzije, ki vključuje različne donorske psevdogene (McCormack in sod., 1989).

Mehanizem genske konverzije je kontinuiran proces, ki se odvija potem, ko limfociti B zapustijo Fabricijevo burzo, multipli dogodki konverzije se namreč odvijajo tekom življenjskega obdobja limfocitov B (Roitt in sod., 1998).

Imunoglobulinski geni se pri kokošjih zarodkih začnejo preurejati v celicah rumenjakeve vrečke, sledi preurejanje v vranici, nato v krvi oziroma v kostnem mozgu. Sledi hkratno preurejanje segmentov vTv in vLv v prednikih limfocitov B v krvi oz. limfoidnih organih. (Higgins in sod., 1995). Ker pa preurejanje ne povzroči bistvenih razlik v genskem zapisu, predniki limfocitov B izražajo praktično enake imunoglobuline.

Zamenjava preurejenih genov z zapisom za Ig s psevdogeni se začne okrog 15. dneva embrionalnega razvoja in se nadaljuje približno 6 tednov. Zamenjava s psevdogeni povzroča navidezne mutacije na meji zamenjanega gena in se dogaja samo v foliklih Fabricijeve burze. Preurejanje genov z zapisom za Ig je neodvisno od primarnih limfoidnih organov (Higgins in sod., 1995).

Mehanizem tvorbe protitelesne raznolikosti se pri kokoših bistveno razlikuje od človeške in mišje tvorbe raznolikosti protiteles. Kokoši tako predstavljajo vrsto, pri kateri je potekla drugačna koevolucija limfoidne strukture in funkcije, kot jo poznamo iz študij modelov kostnega mozga glodalcev in primatov (Ratcliffe, 2006).

2.2.9.3.5 Preurejanje genov za težko verigo

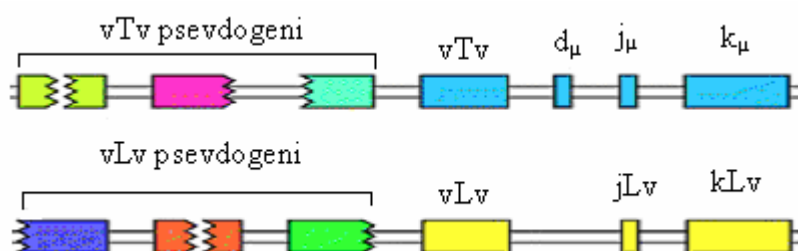
Začne se z vključitvijo enega izmed 16-ih segmentov dTv poleg edinstvenega segmenta jTv, nato pa se združita segmenta v_1Tv in kompleks dTv-jTv. S slednjo rekombinacijo nastane le malo razlik v zapisih za Ig. Pri preurejanju se psevdogeni z gensko konverzijo (rekombinacijo) vrinejo med regiji v_1Tv in dTv ter povečajo raznolikost težkih verig Ig (Pastoret in sod., 1998).

2.2.9.3.6 Preurejanje genov za lahko verigo

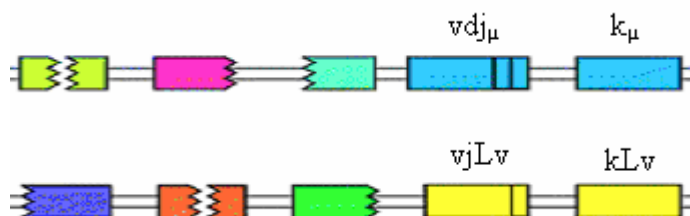
Preurejanje in izražanje genov za lahko verigo je pri kokoših časovno usklajeno s preurejanjem in izražanjem genov za težko verigo μ .

Na lokusu za verigo λ se segment $v_1\lambda$ nahaja 1,8 kb nad enoto $(j-k)\lambda$. Nad $v_1\lambda$ se nahaja 25 psevdogenov $vvLv$, ki so zelo homologni v_1Lv . Razlike med psevdogeni so le v hipervariabilnih regijah. Razlike v variabilni regiji λ lahke verige Ig se povečajo z zamenjavo genov, nenatančnim združevanjem segmentov v , j in k ter točkovnimi mutacijami v genih (Honjo in sod., 2004).

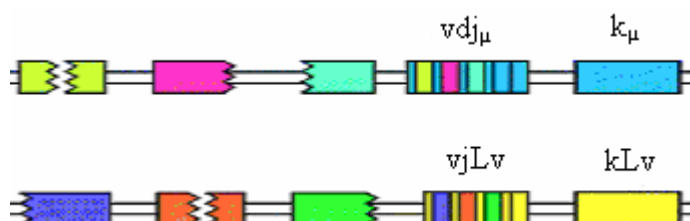
Kokošji Ig geni zarodne linije



Nezreli limfociti B imajo vsi iste preurejene gene V_H in V_λ



Zaporedja psevdogenov V se z gensko konverzijo vključijo med preurejene V gene



Slika 7: Somatska genska konverzija.

Je mehanizem tvorbe diverzitete protiteles pri pticah in zajcih (Honjo in sod., 2004).

2.2.10 Modelna celična linija limfocitov B DT40

Uporaba kokošje celične linije DT40, katere limfociti B lahko izražajo IgM, je zaradi njenih ugodnih lastnosti vse pogostejša, saj se da s to linijo enostavno izvajati genske manipulacije. Prav tako na omenjeni celični liniji potekajo študije B-celične antigen receptorske signalizacije (BCR), regulacije celičnega cikla, genske konverzije in apoptoze (Winding in Berchtold, 2001). Celična linija DT40 je uporaben model za študije funkcije genov. Aktivne hipermutacije se dogajajo tudi v celični kulturi. Linija je bila pridobljena s transformacijo burzalne celice z virusom ptičje levkoze (Honjo in sod., 2004).

2.2.11 Evolucijska ohranjenost zaporedja konstantnega dela Lv

Zaporedja za lahke verige (Lv) Ig različnih razredov vretenčarjev so evolucijsko zelo ohranjena (Davidson in sod., 2008; Greenberg in sod., 1993), vendar se pri različnih razredih vretenčarjev pojavljajo Lv različnih tipov. Pri Ig ptic prevladuje en tip (najmanj 95%, Grant in sod., 1971)Lv, ki je homologna (tako v in k regiji) sesalski Lv tipa λ .

Študije (Greenberg in sod., 1993), ki predstavljajo podatke filogenetsko najstarejših dosedaj znanih Lv so primerjave zaporedij konstantnega dela Lv Ig morskih psov, živih fosilov, ki se zadnjih 400 milijonov let niso spremenili. Čeprav je na genski ravni nastalo veliko sprememb, je napovedana struktura proteina te predniške molekule v osnovi enaka humanim Lv tipa λ , torej sta se v evoluciji struktura in funkcionalna aktivnost Lv od izvirnega (predniškega) stanja zelo malo spremenili (Greenberg in sod., 1993).

2.2.12 Skupne antigenske determinante kokoši in ostalih ptic družine Phasianidae

Študije skupnih antigenskih determinant Ig kokoši, fazanov ter japonskih prepelic (Leslie in Benedict, 1970) kažejo na največjo podobnost IgG Ig fazana ter kokoši, prav tako največjo podobnost Lv ter Fab fragmentov fazanjih in kokošnjih Ig.

Raziskave križnih reaktivnosti, kot posledice podobnih antigenskih determinant na Lv in Tv ter Fab in Fc regijah Ig kokoši, navadnega fazana ter japonske prepelice so pokazale (Leslie in Benedict, 1970), da so Lv kokoši in fazanov antigensko identične, medtem ko Lv prepelic le šibko križno reagirajo z Lv kokoši ali navadnega fazana.

V študiji puranov, prepelic ter fazanov različnih rodov (Ch'ng in Benedict, 1981) so s specifičnimi antiserumi preverjali prisotnost osmih IgG ter štirih kokošnjih IgM alotipov. Izkazalo se je, da je kokošji alotip, definiran kot G-1.7 križno reagiral z izotipi fazana in purana, ne pa z izotipi prepelic. Druga alotipska determinanta (G-1.9) je križno reagirala z alotipom purana in zlatega fazana (*Chrysolophus pictus*). G-1.7 in G-1.9 so verjetno filogenetsko dobro ohranjene determinante in so se polimorfizmi kokošnjih Ig pojavili kasneje, ko se je kokošja linija že odcepila od preostalih ptic družine Phasianidae. Na osnovi alotipskih in izotipskih analiz IgG antigenskih determinant sta avtorja (Ch'ng in Benedict, 1981) sklepala, da so puranji IgG enako sorodni kokošnjim IgG kot fazanji IgG. Pri pragozdni kokoši (prednici današnje kokoši) so našli največ IgG in IgM alotipov prisotnih kot polimorfnih markerjev.

MAB M1 proti kokošnjim IgM (Mockett, 1986) so se vezala na Tv IgM in navzkrižno reagirala tudi s puranjimi ter račjimi Tv IgM. Pokazalo se je, da (v DIBA testu) reagirajo tudi s serumi fazana, pava, vrabca ter vzorci rumenjaka jajca japonske prepelice in race (Narat in sod., 2004).

Komercialno dostopna mAb in pAb, ki so specifično prepoznavala kokošja IgA, IgG ter IgM so križno reagirala s pripadajočimi Ig razredi (izotipi) purana. Slednje dejstvo potrjuje evolucijsko ohranjenost domen na Ig sorodnih ptic. Avtorji (Van Nerom in sod., 1997) navajajo, da so takšna mAb ter pAb uporabna za preiskave humoralnih imunskih odzivov puranov.

Za mAb 3C10 so že bile opisane (Narat in sod., 2004) križne reakcije s kokošnjimi serumskimi IgG, serumskimi Ig purana, fazana ter šibka križna reakcija s serumskimi Ig vrabca. V encimskoimunskem testu DIBA pa mAb pa niso reagirala s serumskimi Ig pava, papige, goloba, ter Ig izoliranimi iz jajčnih rumenjakov race, gosi in prepelice.

Druga mAb 2F10 in 1F5 (proti Tv kokošnjih IgG) so prepoznavala Tv serumskih IgG kokoši in v DIBA testu še serumske Ig purana, pava. Reakcija mAb 2F10 s serumskimi Ig fazana je bila zelo šibka, ni pa bilo pozitivne reakcije z vzorci serumov papige, vrabca in vzorci jajčnih rumenjakov race, gosi ter prepelice. MAb 4E4 je bilo specifično za kokošje IgG in ni reagiralo s serumi drugih vrst ptic (Narat in sod., 2004).

Za Tv μ , α in ν so določili mnogo alotipskih variant (Ch'ng in Benedict, 1981), njihov pomen pa je verjetno v uravnavanju imunskega sistema. Avtorja (Ch'ng in Benedict, 1981) sta na osnovi reaktivnosti serumov z Ab proti osmim alotipom povezanimi s kokošnjimi IgG, poročala o alotipskih oblikah IgG v serumih puranov ter fazanov. Pri drugih vrstah ptic pa jih niso preiskali. Analiza nukleotidnih in napovedanih aminokislinskih zaporedij cDNA je pokazala (verjetno) prisotnost alotipskih variant tudi pri račjih IgG, pri katerih so našli 37 polimorfizmov v α genu, 10 v μ ter 7 v ν genu, ki kodira težko verigo (Lundqvist in sod., 2001).

2.2.13 Dosedaj znana aminokislinska in nukleotidna zaporedja Lv ptic

Grant in sod. (1971) so prvi objavili delna ak zaporedja Lv kokoši in purana. Objavljena zaporedja predstavljajo približno 1/3 celotnega ak zaporedja Lv kokoši in vključujejo N-terminalno zaporedje (20 ak), kratka zaporedja iz variabilnega dela Lv in delno zaporedje (43 ak) konstantnega dela Lv (kLv). Zadnja tri zaporedja sestavljajo C-terminalni del Lv kokoši (32 ak) oziroma purana (33 ak). Grant in sod. (1971) so ugotovili, da se aminokislinski zaporedji kokoši in purana razlikujeta le v 2 ak. Ena od njiju je serin, ki je zadnja ak v zaporedju purana (zaporedje SECS) in ga ni v zaporedju Lv kokoši (zaporedjeSEC).

V istem letu so Kubo in sodelavci (1971) objavili N-terminalno ak zaporedje Lv kokoši (21 ak), ki pa se v zadnjem delu razlikuje od zaporedja, ki so ga objavili Grant in sod. (1971).

Suzuki in sod. (2003) so objavili N-terminalno ak zaporedje (19 ak) Lv in Tv IgG goloba in ju primerjali z ustreznimi zaporedji kokoši in race mlakarice.

Reynaud in sod. (1983) so objavili celotno nukleotidno zaporedje, ki kodira Lv kokoši. Parvari in sod. (1987, 1990) so določili nukleotidna zaporedja klonov, ki kažejo na razlike v variabilnem delu Lv (CDR1, CDR2, CDR3). Omenili so tudi razliko v napovedanem aminokislinskem zaporedju Lv (N→D) v kLv in menili, da takšna zamenjava morda pomeni različen alotip Lv.

McCormack in sod., (neobjavljeno) so leta 1989 v podatkovno zbirko (GenBank) vložili zaporedje za kLv moskovske race (*Cairina moschata*) (M25726) in Magor in sod. (1994a) zaporedje race mlakarice (*Anas platyrhynchos*) (X82069) za Lv. Napovedano aminokislinsko zaporedje (Magor in sod., 1994a) za vLv race mlakarice je 88% identično prej omenjenemu zaporedju moskovske race ter 87% identično zaporedju kokoši. Zaporedje za jLv je 92% identično moskovski raci in kokoši, medtem, ko je zaporedje za kLv 88% identično zaporedju moskovske race in samo 66% identično kokoši. Iz slednjih podatkov lahko sklepamo, da je podobnost zaporedij za kLv v korelaciji z evolucijsko razdaljo omenjenih ptic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LOČEVANJE PODENOT IMUNOGLOBULINOV Z ELEKTROFOREZO, PRENOS BELJAKOVIN NA MEMBRANO IN ENCIMSKOIMUNSKI TEST

Vzorcem imunoglobulinov, za katere smo hoteli dokazati razpad na lahke in težke verige in kasneje dokazati, da mAb prepoznavajo lahke verige, smo dodali reducirajoči agens β -ME končne koncentracije 5%. Za ločevanje lahkih in težkih verig smo izvedli SDS elektroforezo v reducirajočih pogojih.

3.1.1 Elektroforeza

Vzorci serumskih imunoglobulinov smo redčili s PBS (pH 7.2) v razmerju 1:10. Vzorci imunoglobulinov z dodatkom 5% β -ME smo 5 min segrevali na 100°C in nato nanašali 50 μ l vzorca (30 μ l vzorca imunoglobulinov in 20 μ l nanašalnega pufra) na stezo. Končna redčina seruma je bila: 1:20.

Za določitev molekulskih mas podenot imunoglobulinov smo uporabili mešanico desetih barvnih markerjev z molekulskimi masami 11 kDa, 17 kDa, 24 kDa, 34 kDa, 43 kDa, 55 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 130 kDa in 170 kDa (Fermentas, Prestained Protein Ladder).

Elektroforezo smo izvedli z dvema napravama, odvisno od količine proteinov, ki smo jih potrebovali za nadaljnji prenos na membrano (western blotting) in števila različnih vzorcev.

Proteine, ki so ostali v gelu smo pobarvali z barvilom Coomassie blue (PhastGelTM BlueR) in kasneje razbarvali barvilo z očetno kislino.

3.1.2 Prenos beljakovin na membrano (angl. “western blotting”)

Beljakovine smo ločili z aparaturo PhastSystemTM (Pharmacia, Švedska), po programu, ki je že bil opisan (Benčina s sod., 1994). Postopek ločevanja beljakovin je potekal 75 min pri 74 mA v gradientnem gelu (PhastGel, Gradient 8-25).

Potem, ko smo beljakovine ločili z elektroforezo, smo jih prenesli na membrano Immobilon P (Milipore, ZDA) po že opisanem postopku (Benčina s sod., 1994).

Uporabili smo tudi elektroforezo v gelih večjih dimenzij (16 cm x18 cm), beljakovine smo ločili s sistemom LKB (Švedska). Istočasno smo beljakovine ločevali v dveh gelih, zato smo uporabili 30 mA za nabijalni gel ter 40 mA za razslojevalni gel.

Pred prenosom beljakovin na membrano smo s pufrom za prenos (100 ml 10x elektroforetskega pufru, 200 ml metanola, 700 ml destilirane vode) dobro prepojili blazinice in filter papirje. Membrano smo predhodno aktivirali za 2 sek v metanolu, gel pa za 5 min prenesli v pufer za prenos. Na katodni pokrov smo v sledečem vrstnem redu nalagali: 2 blazinici, 4 filter papirje v velikosti gela, gel, membrano v velikosti gela obrnjeno z licem proti gelu, 4 filter papirje v velikosti gela, 2 blazinici. Ob nalaganju vsake plasti smo iztisnili zračne mehurčke, da so se plasti tesno prilegale. Vse skupaj smo zatesnili z anodnim pokrovom. Prenos je potekal z aparaturo Xcell Sure Lock, Blot Module (Invitrogen, ZDA) 1 h pri izračunani površini gela x 0.8 mA.

Ta način prenosa smo uporabili tudi za "reducirane" IgG navadnega fazana, sijajnega fazana ter beloglavega jastreba, katerih Lv so bila nato določena N- terminalna aminokislinska zaporedja (opisano v točki 3.2.1).

3.1.3 Encimskoimunski test ("imunoblot")

Membrano Immobilon P (Milipore, ZDA) smo najprej 40 min blokirali v 0.5% Tween PBS (PBST). Nato smo membrano 1 h inkubirali v mišjih mAb proti kokošjim IgG (1:5) ali v mAb CH-31 (1:5000) in trikrat spirali po 15 min v 0.05% PBST. Sledila je inkubacija 40 min v kunčjih protitelesih proti mišjim IgG konjugiranih s peroksidazo (Sigma A 9044, 1:2000). Po prvi inkubaciji smo membrano trikrat po 15 min spirali v 0.05% PBST. Po drugi inkubaciji pa dvakrat po 15 min v 0.05% PBST ter enkrat 15 min v PBS.

Na koncu smo dodali substrat True blue (Kirkegaard & Perry Laboratories) in ocenili intenziteto reakcije.

Za pozitivno kontrolo reakcije z lahkimi verigami smo uporabili komercialno dostopna mišja monoklonska protitelesa proti lahkim verigam kokošjih IgG (CH-31, Sigma, 1:1000).

3.1.4 Preverjanje aktivnosti mAb z metodo DIBA (angl. »dot-immunobinding assay«)

Z encimskoimunskim testom, znanim tudi pod imenom DIBA (opis v Benčina in sod., 2005) smo testirali supernatant, ki je vseboval mAb 3C10. V ta namen smo izvedli DIBA test v katerem so bili tarčni antigeni vezani na membrano Immobilon P, inkubirani v serumih ptic.

DIBA test je potekal v treh stopnjah: 1- vezava Ag (ptičjih protiteles), 2- vezava mAb 3C10 (to je mišje mAb podrazreda IgG1, ki prepoznava kokošje IgG (IgY) (ali CH-31, prav tako mišje mAb podrazreda IgG1) na serumske Ig različnih ptic, 3- vezava kunčjih protiteles IgG, ki prepoznava mišje IgG, konjugiranih s hrenovo peroksidazo.

Z omenjenim testom smo testirali ali monoklonska protitelesa (mAb) 3C10 prepoznava serume sledečih ptic: kokoši, fazana (navadnega, diamantnega, Swinhojevega, sijajnega), tragopana, pava, jerebice, prepelice, pegatke, beloglavega jastreba, bele štorke, sončne aratinge, are, ter kakaduja. Antigeni so bili redčeni s pufrom PBS pH 7.2 v razmerjih 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, 1:25600.

3.1.4.1 Indirektni encimskoimunski test

Na membrano Immobilon P smo narisali kvadratke velikosti 25 mm², jo 2 sek aktivirali v metanolu in nato prenesli v destilirano vodo za 5 min. Za določanje specifične in navzkrižne reaktivnosti mišjih mAb 3C10 smo kot vir protiteles, ki so v tem primeru predstavljali antigen, uporabili serume sledečih ptic: kokoši, fazana (navadnega, diamantnega, Swinhojevega, sijajnega), pava, tragopana, pegatke, jerebice, prepelice, beloglavega jastreba, bele štorke, are, sončne aratinge, ter kakaduja. Antigeni so bili redčeni s pufrom PBS pH 7.2 v razmerjih 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 in 1:25600.

Na delno osušeno membrano smo nato nanašali 2.5 µl redčin serumov ptic.

Nato smo membrano 45 min blokirali v 0.5% PBST pri sobni temperaturi. V naslednji stopnji smo posamezne trakove prenesli v redčine supernatantov mAb 3C10 redčenih v PBS (1:5) ter referenčnega CH-31 (Sigma, C-7910) redčenega v PBS (1:10000). Trakove smo inkubirali pri sobni temperaturi 60 min. Po inkubaciji smo trakove spirali z 0.05% PBST trikrat po 10 min, pri čemer so se nespecifična Ab sprala z membrane in jih inkubirali 45 min v sekundarnih Ab: kunčjih Ab proti mišjim IgG konjugiranih s peroksidazo (Sigma A 9044), redčenih v razmerju 1:2000. Trakove smo nato spirali še dvakrat po 10 min v 0.05% PBST in enkrat 10 min v

PBS. Osušenim trakovom smo dodali encimski substrat True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories, ZDA) in opazovali pojav modrega obarvanja kot posledico nastanka netopnega produkta. Intenziteto rezultata testa smo ocenili z oznakami +++ za močno obarvanje, ++ za dobro vidno, vendar manj intenzivno obarvanje in + za rahlo modro obarvanje, vendar še vedno jasno ločljivo glede na negativno kontrolo. Po pojavu modrega obarvanja smo membrano 5 min spirali v destilirani vodi.

Za pozitivno kontrolo smo na membrano nanесли serum kokoši redčen (1:100, 1:400, 1:1000, 1:1600, 1:6400, 1:10000, 1:25600 ter 1:100000) v PBS (pH 7.2). Za negativno kontrolo smo imeli serume ptic (golob, gos), ki ne reagirajo z mAb 3C10 (že opisano v Biček, 2004). Pozitivno kontrolo je predstavljalo tudi referenčno komercialno mAb CH-31 (Sigma, ZDA).

3.1.4.2 Direktni encimskoimunski test

Z direktnim encimskoimunskim testom na membrani (DIBA) smo preverjali antigensko sorodnost IgG.

Na trakove membrane Immobilon P smo nanесли po 2.5 μ l vzorcev serumov kokoši, fazana (navadnega, diamantnega, Swinhojevega, sijajnega), pava, tragopana, pegatke, jerebice, prepelice, beloglavega jastreba, bele štorke, are, sončne aratinge, ter kakaduja v povečanih razredčinah (1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, ter 1:25600) pripravljenih v PBS (pH 7.2). Trakove smo blokirali v 0.5% PBST 45 minut. Sledila je inkubacija 45 min v kunčjih protitelesih proti kokošjim IgG, konjugiranih s peroksidazo (Sigma, A 9044), redčenih v PBS 1:1000.

Trakove smo po inkubaciji spirali dvakrat po 10 min v 0.05% PBST in enkrat 10 min v PBS, jo posušili in dodala substrat True Blue (Kirkegaard & Perry Laboratories). Modro obarvanje je dokaz za prisotnost IgG v testiranem vzorcu. Test je potekal pri sobni temperaturi.

3.2 DOLOČITEV N- TERMINALNEGA ZAPOREDJA LAHKIH VERIG

3.2.1 N-terminalna analiza zaporedij lahkih verig

Poskušali smo določiti N-terminalno aminokislinsko zaporedje lahkih verig Ig iz vzorcev serumov navadnega fazana, diamantnega fazana in beloglavega jastreba. Njihove Lv je očitno prepoznavalo mAb 3C10 (Slika 9, steze 3, 7 in 8). Vzorcem serumov (~100 µl) je bil dodan ~40% amonijev sulfat, da smo ločili Ig (ki so se oborili) od drugih serumskih proteinov, ki so ostali v supernatantu. Vzorce imunoglobulinov (redčene 1:20 glede na volumen seruma), ki jim je bil dodan 5% β-ME, smo z elektroforezo ločili na Tv in Lv in te proteine prenesli na membrano Immobilon P (opisano v točki 3.1.2). Za prenos smo uporabili 100 ml 100 mM pufra CAPS (Sigma, ZDA), 100 ml MeOH ter 800 ml destilirane vode. Vsak od vzorcev je bil v dveh ločenih stezah. V eni stezi smo določili pozicijo Lv, ki reagira z mAb 3C10 z imunoblotom (slika 9, steze 3, 7 in 8) in Tv v drugi stezi pobarvali s Coomassie blue, izrezali iz membrane (vzorec na traku velikosti približno 2x5 mm) in jih dali v N-terminalno analizo zaporedij k prof. dr. I. Križaju (Institut Jožef Stefan v Ljubljani). Analiza zaporedij je bila izvedena na aparaturi Procise protein sequencing system 492A (PE Applied Biosystems).

3.3 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

3.3.1 Izolacija DNA ptic

3.3.1.1 Izolacija DNA iz kulture kokošjih limfocitov B

DNA kokošjih limfocitov B celične linije DT40 (IgM+) smo izolirali po protokolu za izolacijo genomske DNA iz celične kulture (Strauss, 1998). Začeli smo z delom postopka, ki opisuje izolacijo DNA iz celične kulture.

Suspenzijsko kulturo limfocitov B (celična linija DT 40, IgM+) smo centrifugirali 5 min pri 500x g (=1400 rpm) ter zavrgli supernatant. Celice smo resuspendirali v 5 ml ledeno hladnega PBS in centrifugirali 5 min pri 500x g ter ponovno zavrgli supernatant. Postopek spiranja ter centrifugiranja z ledeno hladnim PBS smo ponovili trikrat. Celice smo nato resuspendirali v 1 ml pufra za lizo (100 mM NaCl, 10 mM Tris·Cl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS) dodali 20 µl proteinaze K (Life Technologies, ZDA) ter inkubirali pri stresanju 750 rpm 18 ur na 50°C. Po inkubaciji smo ekstrahirali vzorec z 1 ml spodnje faze hladnega PCI (fenol, kloroform, izoamil alkohol) in centrifugirali (Eppendorf 5414, Nemčija) 10 min pri 1700x g. Nato smo odstranili zgornjo fazo, jo prenesli v novo epico in dodali 200 µl 7.5M hladnega amonijevega acetata in 400 µl hladnega 96% etanola. DNA je takoj tvorila precipitat, epico smo previdno pretresli, da se je DNA zgostila ter centrifugirali pri 1700x g 2 min. Previdno smo odlili supernatant in peletu dodali 500 µl hladnega 70% etanola ter ponovno centrifugirali pri 1700x g 2 min. Odlili smo etanol in preostanek etanola odpipetirali z nasprotne strani vidnega peleta. Epico smo 15 min sušili do voskaste konzistence. DNA smo resuspendirali v 100 µl TE pufra ter jo shranili na 4°C.

3.3.1.2 Izolacija DNA iz tkiv ptic

DNA navadnega fazana in poljske jerebice smo izolirali iz vranic, ki smo jih dobili od prof.dr. Andreja Bidovca, Veterinarska fakulteta v Ljubljani (Beltinci, farma fazanov in jerebic).

DNA moskovske race smo izolirali iz Fabricijeve burze, ki smo jo dobili z Veterinarske fakultete v Budimpešti (prof. dr. Tamás Bakonyi).

Zatehtali smo 200 mg tkiva vranice oziroma Fabricijeve burze, ga v terilnici prelili s tekočim dušikom in trli tkivo z batom, dokler se ni zdrobilo v prah. Nadaljnji postopek izolacije DNA je enak kot v zgoraj opisanem protokolu (točka 3.3.1.1 Izolacija DNA iz suspenzijske celične kulture limfocitov B).

3.3.1.3 Izolacija DNA iz celic eksudata sinusa pava in purana

DNA purana in pava smo izolirali iz sedimenta celic eksudata podočesnega sinusa puranov iz kooperacijske reje (Jata, J. Poje, DVM). Purani so bili okuženi z bakterijo *Mycoplasma gallisepticum*, ki je povzročila močno oteklino podočesnih sinusov, v katerih je bilo veliko vnetnega eksudata. Eksudat je bil zbran iz sinusov puranov ter pavov in dostavljen v Laboratorij za mikoplazme, Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti leta 2002 ter zamrznjen (-20°C). Sediment je vseboval epitelne celice, heterofilce in B- limfocite (D. Benčina- os. stiki).

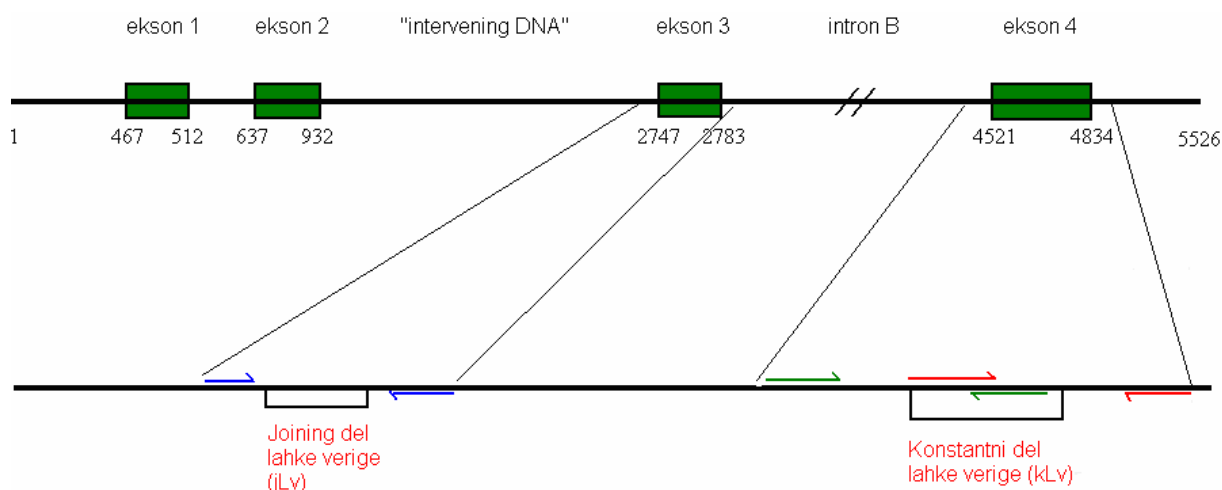
Eksudata sinusa purana ter pava smo centrifugirali 5 min na 1400 rpm na 4°C. Nadaljnji postopek je enak kot pri izolaciji DNA iz suspenzijske kulture limfocitov B DT40 (točka 3.3.1.1).

3.3.1.4 Redčenje DNA (priprava delovne raztopine)

Izolirano DNA, raztopljeno v TE pufru smo redčili z avtoklavirano, prefiltrirano vodo Mili Q v razmerju 1:10, 1:100 in 1:1000, ter za verižno reakcijo s polimerazo vedno uporabili delovno raztopino DNA (1:1000) koncentracije približno 5 ng/μl.

3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Odsek DNA v delu introna B, eksonu 4 ter delu regije na 3' koncu za eksonom 4 smo pomnožili z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Metoda omogoča pomnoževanje specifičnih odsekov DNA v *in vitro* pogojih. Regije, ki smo jih pomnoževali z metodo verižne reakcije s polimerazo, so prikazane na Sliki 8.



Slika 8: Shematski prikaz regij, pomnoženih z verižno reakcijo s polimerazo.

Regije pri kokoši (GenBank, M24403) kodirajo joining del (jLv) ter konstantni del lahke verige Ig (kLv), ki smo jih pomnoževali z verižno reakcijo s polimerazo. Legenda kombinacij začetnih oligonukleotidov: modra barva: JOINING F in JOINING R, zelena barva: CONSTANT F1 in CONSTANT R1, rdeča barva: CLF in LIGHT R.

Za 30 μ l reakcijske mešanice smo potrebovali naslednje sestavine: 18.45 μ l bidestilirane vode, 3.0 μ l PCR pufra (Fermentas, Litva), 1.5 μ l 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2.4 μ l 25 mM MgCl₂ (Fermentas, Litva), 1.5 μ l 5' začetnega oligonukleotida (L) (Jena Bioscience, Nemčija), 1.5 μ l 3' začetnega oligonukleotida (D) (Jena Bioscience, Nemčija), 0.15 μ l Taq DNA polimeraze (Fermentas, Litva) ter 1.5 μ l DNA.

Reakcijsko mešanico smo vstavili v mikroprocesorsko vodeni termostat (Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700, ZDA). Reakcija je potekala v naslednjih stopnjah: začetna denaturacija pri 94°C 5 min, denaturacija pri 94°C 1 min, prileganje odvisno od kombinacije začetnih oligonukleotidov pri 56°C (57°C/52°C) 30 sek, sinteza pri 72°C 1 min, zaključna sinteza pri 72°C 1 min ter ohlajanje pri 4°C. Število ciklov: 35.

Preglednica 3: Zaporedja začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo.

Področje v genu	Levi začetni oligonukleotid (ime, nukleotidno zaporedje)	Desni začetni oligonukleotid (ime, nukleotidno zaporedje)	Ta
Del introna B in del eksona 4	CONSTANT F1: ATGGATGGGTGGATGTGTTT	CONSTANT R1: CCTCTTCAGGGTCTTCGTGA	56°C
Ekson 4 in del zaporedja na 3' koncu za stop kodonom	CLF: CTAGGCCAGCCCAAGGTG	LIGHT R: CGCAAAGGACACAGAGACA	57°C
Del »intervening DNA«, ekson 3 in del introna B	JOINING F: AGTGGGAGGTTTTTGCATTG	JOINING R: ACCCCAAATCACCAAAAAT	52°C

Opomba: prvo kombinacijo začetnih oligonukleotidov (CONSTANT F1 in CONSTANT R1) smo izbrali na zaporedju DNA kokoši, drugo (CLF in LIGHT R) in tretjo (JOINING F in JOINING R) pa na podlagi primerjave ustreznih zaporedij gena za lahko verigo Ig kokoši (M24403) in race (M25726). Ta= temperatura prileganja začetnih oligonukleotidov.

Za dokazovanje kokošje DNA smo uporabili oligonukleotida, ki sta prej preverjeno pomnoževala DNA kokoši (asist. dr. Dušan Terčič, Oddelek za zootehniko). To sta začetna oligonukleotida ROS 74A in ROS 74B, velikost produkta pa 323. Njuno zaporedje: ROS 74A: 5'- AGC ACT TTT GGT GTT ACC GG- 3', ROS 74B: 5'- CAG CTG ATG CTT CCA CAG AA- 3'.

Z vsemi pari začetnih oligonukleotidov smo z metodo verižne reakcije s polimerazo pomnoževali DNA kokoši, purana, navadnega fazana, poljske jerebice ter pava.

Z začetnima oligonukleotidoma CLF+LIGHT R smo pomnoževali DNA gosi, goloba, sokola selca, lesne sove ter papig (skobčevke in sivega žakoja). Ker slednje reakcije pri temperaturi prileganja 57°C niso uspele, smo jih dodatno optimizirali pri temperaturi od 52°C-60° v gradientnem mikroprocesorsko vodenem termostatu (My CyclyerTM, thermal cyclyer, Biorad, ZDA).

Za pozitivno kontrolo pri metodi verižne reakcije s polimerazo smo uporabili DNA supenzijske celične kulture kokošjih limfocitov B linije DT40 in delovno raztopino DNA

kokoši, izolirano iz krvi po protokolu: Izolacija DNA iz krvi ptic (asist.dr. Dušan Terčič, Oddelek za zootehniko).

Za negativno kontrolo smo namesto DNA uporabili destilirano vodo (delež vode smo povečali na račun DNA).

3.3.2.1 Elektroforeza DNA v agaroznem gelu

Nastanek in dolžino produktov verižne reakcije s polimerazo smo preverili z elektroforezo na 1% agaroznem gelu. Opazovanje DNA produktov, ločenih po velikosti omogoča etidijev bromid (EtBr), ki se vgradi med bazne pare in fluorescira pri svetlobi valovne dolžine okrog 300 nm.

Za pripravo 1% agaroznega gela smo v mikrovalovni pečici zavreli mešanico 60 g agaroze (Sigma, ZDA) in 70 µl 0.5 x TBE pufra (0.045 M Tris boratni pufer, 0.001 M EDTA). S pomočjo magnetnega mešalca smo mešanico primerno ohladili, dodali 0.5 µl EtBr. Mešanico smo nato prelili v model z glavnički za nastanek gela. Ko se je gel strdil, smo ga skupaj z modelom vstavili v elektroforezno napravo z dodatkom 0.5 x TBE pufra, nato smo iz gela odstranili glavničke. V nastale vdolbinice smo nanесли mešanico 5 µl vzorca in 1 µl aplikacijskega pufra za nanašanje vzorcev.

Velikost fragmentov DNA smo ocenili z uporabo elektroforeze (Pharmacia, LKB·GPS 200/400, Švedska), ki je potekala 20 min pri sobni temperaturi pri napetosti električnega toka 100 V. Nastale produkte verižne reakcije s polimerazo (DNA označeno z EtBr) smo po končani elektroforezi fotografirali s kamero (Gel Doc 1000, BioRad, ZDA).

3.3.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)

Ustrezno označene in zapakirane vzorce produktov verižne reakcije s polimerazo ter pripadajoče kombinacije začetnih oligonukleotidov smo poslali na sekvenciranje v Korejo (Macrogen). Fragmente so sekvencirali z obeh koncev.

3.4 BIOINFORMACIJSKE METODE

3.4.1 Uporabljena programska orodja in analiza podatkov

Preglednica 4: Pregled uporabljenih bioinformacijskih metod.

Bioinformacijsko orodje	Namen	Internetna stran
BLAST (GenBank) (Altschul in sod., 1997)	Poravnava nukleotidnega zaporedja, ki pri kokoši (GenBank, M24403) in raci (GenBank, M25726) kodira joining in konstantni del lahke verige Ig.	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Primer3 (Rozen in Skaletsky, 2000)	Izbira začetnih oligonukleotidov na podlagi poravnave kokošnjega in račjega zaporedja, ki kodira joining ter konstantni del lahke verige Ig.	http://frodo.wi.mit.edu/
Chromas (McCarthy, 1998)	Urejanje in pregledovanje nukleotidnih zaporedij dobljenih s sekvenciranjem	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
ClustalW (Thompson in sod., 1994)	Multiple poravnave zaporedij in izdelava kladograma	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/
BCM search launcher (Smith in sod., 1996)	Prevod nukleotidnega zaporedja v aminokislinsko zaporedje in izbira pravega bralnega okvirja (Reynaud, 1983)	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html
ExpASy (Guex in sod., 1999)	Določitev teoretične izoelektrične točke in molske mase Ig	http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html
Antheprot (Geourjon in sod., 1991)	Določitev antigenskih determinant na Ig	http://antheprot-pbil.ibcp.fr/

4 REZULTATI

Raziskave so vključevale encimskoimunске teste (DIBA, imunoblot) ter določevanja nukleotidnih zaporedij za Lv po pomnožitvi ustreznega dela DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo. V DIBA testu ter imunoblotu smo ugotavljali reakcije mAb 3C10 (pridobljeno je bilo v našem laboratoriju) s serumskimi Ig različnih vrst ptic ter za pozitivno kontrolo uporabili komercialno referenčno mAb CH-31 (Sigma).

4.1 ENCIMSKOIMUNSKI TEST DIBA

4.1.1 Reakcije serumov ptic z mAb 3C10 v encimskoimunskem testu DIBA

Znano je bilo (Narat in sod., 2004), da mAb 3C10 v DIBA testu dobro reagira s serumskimi Ig kokoši, purana in fazana, prav tako pa je bila opisana šibka reakcija s serumskimi vzorci vrabca. V tej raziskavi smo testirali tudi serume 15 vrst ptic, ki še niso bili testirani.

V dvostopenjskem imunoencimskem testu DIBA so z obema monoklonskima Ab (3C10 in CH-31) močno reagirali serumi (tudi v redčini seruma 10^{-3} in več) sledečih ptic: navadnega, diamantnega in Swinhojevega fazana ter beloglavega jastreba.



Z obema mAb so v DIBA testu reagirali serumi sledečih ptic: sijajnega fazana, tragopana in pegatke. Iz Preglednice 6 je razvidno, da se je na serumske Ig sijajnega fazana in tragopana mAb CH-31 bolje vezalo kot mAb 3C10. Na serumske Ig sončne aratinge se je prav tako mAb CH-31 bolje vezalo kot 3C10. Razlike v vezavi pa so bile večje v primeru serumskih Ig pava (bolj podrobno razdelano v nadaljevanju), saj mAb 3C10 serumskih Ig pava v DIBA testu ne prepozna (niti pri redčitvi seruma 1:100), medtem, ko se CH-31 dobro veže na serumske Ig pava.

Ob pregledu rezultatov DIBA testa vidimo, da mAb 3C10 prepozna serumske Ig pegatke, medtem ko jih CH-31 ne prepozna oziroma je bila reakcija komaj zaznavna (zelo šibka).

Na serume sledečih ptic pa se mAb (3C10 in CH-31) niso vezala: na serumske Ig: are in kakaduja ter bele štorčlje. Prav tako ni bilo reakcij 3C10 s serumi: japonske prepelice, različnih rac (indijske tekačice, nevestine race), različnih gosi (siva gos, kanadska gos, andaluzijska gos), (črnega) laboda, goloba, (lesne) sove, kanarčka, papige skobčevke ter z Ig izoliranimi iz rumenjaka nojevega jajca (ni prikazano na sliki).

Način ocenjevanja reakcije mAb 3C10 ter CH-31 v DIBA testu je v nadaljevanju prikazan na primeru diamantnega fazana (Preglednica 5).

Preglednica 5: Prikaz ocenjevanja velikosti reakcije serumskih Ig na primeru diamantnega fazana z mAb 3C10 in referenčnim CH-31 v DIBA testu.

	mAb	
	3C10	CH-31
Trakova z nanešenimi serumskimi Ig diamantnega fazana		
Označitev velikosti reakcije v testu DIBA (navpično)	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++

Opomba: na obeh trakovih si od leve proti desno sledijo redčitve seruma: 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 in 1:25600.

Preglednica 6: Reakcije serumov ptic testiranih v DIBA testu z mAb 3C10 ter referenčnim komercialnim mAb CH-31 (Sigma).

Izvor seruma (vrsta ptice)	Rezultat DIBA testa pri različnih redčitvah serumov z mAb 3C10 in referenčnim CH-31									
	Redčitve vzorcev serumov ptic									
	1:100		1:400		1:1600		1:6400		1:25600	
	3C10	CH-31	3C10	CH-31	3C10	CH-31	3C10	CH-31	3C10	CH-31
Kokoš	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Navadni fazan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Diamantni fazan	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Swinhojev fazan	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+	+
Sijajni fazan	+	++	+	++	+	++	-	++	-	++
Tragopan	+	++	+	++	(+)	++	-	++	-	++
Pav	-	++	-	++	-	+	-	+	-	+
Jerebica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prepelica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pegatka	+	(+)	+	-	(+)	-	-	-	-	-
Beloglavi* jastreb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
Sončna* aratinga	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	(+)
Ara*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kakadu*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bela štoklja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Opomba: ocena reakcij: +++ zelo močna reakcija; ++ močna reakcija; + vidna pozitivna reakcija; (+) komaj zaznavna reakcija; - negativna reakcija. *Vzorci serumov smo dobili z univerze v Giessen-u (dr. Ursula Heffels-Redmann), preostale serume pa z Veterinarske fakultete v Ljubljani (dr. Jožko Račnik).

4.1.2 Reakcije serumov ptic z referenčnim mAb CH-31

Referenčno mAb CH-31 (Sigma) je pokazalo zelo podobne reakcije kot mAb 3C10, pri nekaterih vrstah ptic, npr. pavu pa boljše reakcije. Tudi to mAb je močno reagiralo s serumi navadnega, diamantnega, Swinhojevega fazana ter beloglavega jastreba, ni pa bilo pozitivnih reakcij s serumom prepelice in jerebice. Primerjava reakcij mAb CH-31 in mAb 3C10 v testu DIBA za različne vrste ptic je prikazana v Preglednici 6.

Skladno z informacijami prodajalca je mAb CH-31 prepoznaval Lv v serumih kokoši in puranov, ni pa reagiral s serumi race, gosi, goloba ali rumenjacom noja. Glede na podatke mAb ne reagira niti s serumi krokarja in čaplje, vendar takih serumov nismo testirali.

4.2 LOČEVANJE DELOV Ig Z ELEKTROFOREZO

4.2.1 Imunoblot

4.2.1.1 Reakcije mAb 3C10 z imunoglobulini različnih vrst ptic

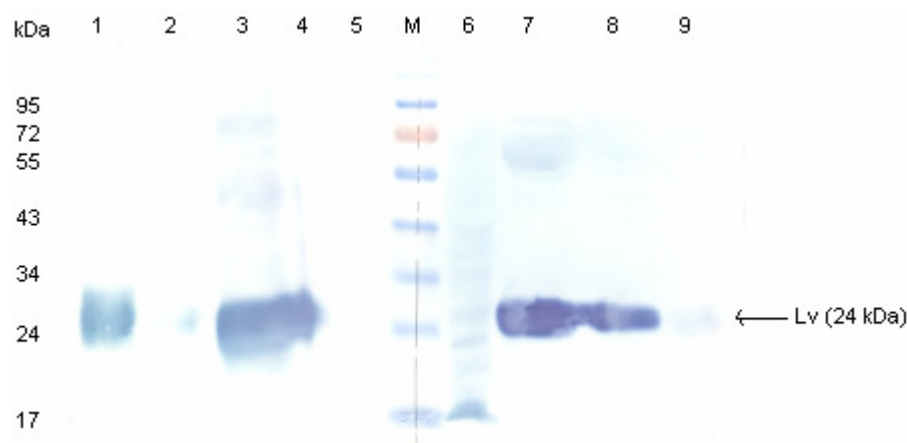
Reakcije mAb 3C10 smo testirali z imunoblotti in celimi molekulami serumskih Ig ali po tretiranju serumov z β -merkaptoetanolom (β -ME), ki povzroči odcepitev lahkih verig (Lv) od težkih verig (Tv) imunoglobulinov.

4.2.1.2 Reakcije »nereduciranih« imunoglobulinov z mAb 3C10 in mAb CH-31

Pri vseh vrstah ptic pri katerih sta prepoznavali Lv (opisano v naslednjem delu) sta mAb 3C10 in CH-31 reagirali tudi s celimi molekulami Ig. Razlike pa smo opazili pri analizah serumov pava in pegatke. Pri analizah reakcij serumskih proteinov pava so v vzorcih, ki jim ni bil dodan β -ME močno reagirali proteini z molekulskimi masami okoli 170, 200 in več kot 200 kDa. Če je bil vzorcu seruma dodan β -ME, mAb 3C10 ni reagiralo z nobenim proteinom. Zelo podobne rezultate je dala analiza reakcij mAb 3C10 za vzorce seruma pegatke. V imunoblottu je relativno intenzivno reagiral okoli 170 kDa velik protein (ni prikazano na sliki), če pa je bil vzorcu dodan β -ME pa mAb 3C10 ni reagiralo s proteini seruma. Za razliko od mAb 3C10, je mAb CH-31 dobro reagiralo, če so bili Ig seruma pava reducirani, kot je prikazano v nadaljevanju (Slika 10, steza 5). Nereducirane Ig sončne aratinge je prepoznavalo le mAb CH-31, ne pa mAb 3C10 (ni prikazano), njene Lv pa niso reagirale niti z mAb CH-31.

Z mAb 3C10 v imunoblotih niso reagirali proteini serumov prepelice, rac (indijska tekačica, nevestina rasa), gosi (kanadska gos, andaluzijska gos), (črnega) laboda, (bele) štoklje, vrabca, goloba, papig (skobčevka, ara), in kanarčka.

Prav tako z mAb 3C10 niso reagirali proteini vzorcev rumenjakov (redčitev 1:40 ali 1:80) japonske prepelice, poljske jerebice in noja. (Ker ni bilo pozitivnih reakcij, slike teh imunoblotov niso prikazane.)



Slika 9: Vezava mAb 3C10 na lahke verige (Lv) serumskih Ig v imunoblotu.

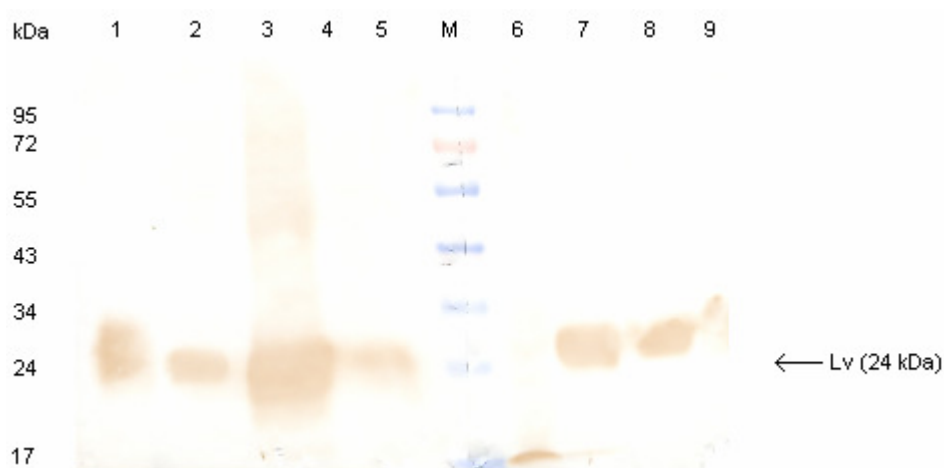
Vzorci: 1: kokoš*, 2: puran*, 3: beloglavi jastreb*, 4: pegatka*, 5: pav*, M: označevalec molekulskih mas; lestvica je označena na levi strani slike, 6: jerebica*, 7: diamantni fazan*, 8: navadni fazan*, 9: tragopan*. (* pomeni dodatek β -ME).

- 1: IgG kokoši očiščen iz rumenjaka z AMS (redčitev 1:50 glede na izvorni volumen)
- 2: serum purana (redčitev 1:50)
- 3: serum beloglavega jastreba (redčitev 1:50)
- 4: serum pegatke (redčitev 1:50)
- 5: serum pava (redčitev 1:50)
- 6: supernatant ekstrakta iz vranice jerebice (redčitev 1:20)
- 7: serum diamantnega fazana (redčitev 1:50)
- 8: serum navadnega fazana (redčitev 1:50)
- 9: serum tragopana (redčitev 1:50)

4.2.1.3 Reakcije lahkih verig (Lv) imunoglobulinov z mAb 3C10 in CH-31

Znano je bilo, da mAb 3C10 in CH-31 prepoznavata Lv kokoši, navadnega fazana in purana (Narat in sod., 2004; opis za mAb CH-31 Sigma. Product No.C-7910). Naše analize so pokazale, da ti dve monoklonski protitelesi prepoznavata proteine, ki ustrezajo Lv tudi pri nekaterih drugih vrstah ptic in da je specifičnost njune vezave precej podobna. MAb 3C10 je poleg reakcij z Lv kokoši in navadnega fazana, prepoznavalo proteine, ki ustrezajo Lv tudi pri vzorcih serumov purana, diamantnega ter Swinhojevega fazana, tragopana in beloglavega jastreba (Slika 9, steze 2, 3, 7 in 9).

Lv enakih molekularskih mas je prepoznavalo tudi mAb CH-31, ki je prepoznavalo Lv tudi v vzorcu seruma pava (Slika 10, steza 5).



Slika 10: Vezava referenčnih mAb CH-31 na Lv serumskih Ig v imunoblotu.

Vzorci: 1: kokoš*, 2: puran*, 3: beloglavi jastreb*, 4: pegatka*, 5: pav*, M: označevalec molekularskih mas; lestvica je označena na levi strani slike, 6: jerebica*, 7: diamantni fazan*, 8: navadni fazan*, 9: tragopan* (* pomeni dodatek β -merkaptetoetanol). Pripomba: ponovljeni test je pokazal, da Lv pegatke (in tudi ne Ig) ne reagirajo z mAb CH-31.

Zaporedni imunoblotti z mAb 1F5, ki prepoznavajo težke verige IgG (IgY) oziroma z mAb M1 (proti težkim verigam IgM) so potrdili, da so bili v vseh primerih, ko so Lv reagirale z mAb 3C10 in CH-31, imunoglobulini teh vzorcev serumov ločeni na Lv in Tv (IgG in IgM) (prikazano v Prilogi C, Slika 22).

4.2.1.4 Vezava mAb 3C10 na native Ig

MAb 3C10 prepoznava native imunoglobuline (specifična protitelesa) vezana na bakterije in viruse.

Znano je, da mAb 1F5/3G2 pridobljeni v istem obdobju kot mAb 3C10, prepoznava epitope kokošjih, puranjih in fazanjih protiteles, ki se v imunoperoksidaznem testu vežejo na kolonije patogenih vrst ptičjih mikoplazem in na njihove proteine v imunoblotih (Narat in sod. 2004). V tej nalogi smo take teste opravili z mAb 3C10. V tristopenjskem indirektnem imunoperoksidaznem testu, v katerem so antigen predstavljale native kolonije *Mycoplasma gallisepticum* je bilo mogoče specifična protitelesa v serumih okuženih kokoši, fazanov, puranov in pavov dokazati z uporabo mAb 3C10, ki se je vezalo na protitelesa teh vrst ptic.

MAb 3C10 je omogočal dokazovanje specifičnih protiteles tudi v serumih beloglavega jastreba (proti virusu atipične kokošje kuge), pegatke, sončne aratinge in tragopana (proti bakteriji *Ornithobacterium rhinotracheale*).

4.2.1.5 Primerjava reakcij mAb 3C10 in CH-31 s serumskimi Ig ptic

MAb 3C10 reagira z Lv imunoglobulinov sledečih ptic: kokoši, purana, diamantnega fazana, tragopana in beloglavega jastreba.

V naših testih je bilo dokazano, da mAb 3C10 prepoznava Ig, in sicer Lv pri različnih vrstah ptic, ki spadajo v družino Phasianidae (poljske kure) in Numididae (pegatke) reda Galliformes (kure) ter družino Accipitridae (orli) reda Falconiformes (ujede). Kot je prikazano v Preglednici 7, so bile reakcije tega mAb primerljive s tistimi, ki smo jih ugotovili za mAb CH-31, ki je referenčno mAb za Lv kokoši in purana.

Primerjave reaktivnosti teh dveh mAb pa so se vseeno razlikovale pri serumih nekaterih vrst ptic (pav, pegatka) verjetno zato, ker prepoznavata različne antigenske determinante (epitope) na Lv. V imunoblotu z vzorcem seruma jerebice mAb 3C10 ali mAb CH-31 nista reagirali, medtem ko je mAb M1 (za Tv IgM) v zaporednem imunoblotu relativno intenzivno reagiral s Tv IgM jerebice (prikazano v Prilogi C, Slika 22).

Preglednica 7: Primerjava reakcij mAb 3C10 in komercialnega mAb CH-31 (Sigma).

Izvor seruma (vrsta ptice)	mAb 3C10	mAb CH-31 (Sigma)
Kokoš	Lv * +++	Lv * +++
Puran	Lv +	Lv * ++
Navadni fazan	Lv * +++	Lv +++
Diamantni fazan	Lv +++	Lv +++
Swinhojev fazan	Lv ++	Lv ++
Sijajni fazan	Lv –	Lv –
Tragopan	Lv +	Lv +
Pav	Lv – Opomba: prepozna le nereducirane Ig	Lv ++ Opomba: (oba mAb prepoznavata pavje Ig, če so vezani na kolonije <i>Mycoplasma-e gallisepticum</i>)
Poljska jerebica	Ni reakcije.	Ni reakcije.
Prepelica	Ni reakcije.	Ni reakcije.
Pegatka	Lv – Opomba: Prepozna le nereducirane Ig	Ni reakcije.
Sončna aratinga	Ni reakcije.	Lv – Opomba: Prepozna le nereducirane Ig
Beloglavi jastreb	Lv +++	Lv +++

Opomba: ocenjevanje intenzitete obarvanje reakcije: +++ zelo močna reakcija, ++ srednje močna reakcija, + šibka reakcija, – negativna reakcija. * Reakcije so bile dokazane že pred našo raziskavo.

4.3 ANALIZA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG

Za vzorec Lv (~24 kDa) seruma navadnega fazana je bilo določeno N- terminalno aminokislinsko zaporedje: ALTQPASVSANPGETVKITX. To zaporedje je v vseh 19-ih določenih aminokislinskih ostankih identično že objavljenim zaporedjem Lv kokoši in purana (Grant in sod., 1971; Reynaud in sod., 1983). Dvajsetega aminokislinskega ostanka ni bilo mogoče določiti, je pa zelo verjetno cistein, kot je to pri kokoši in puranu (prof. dr. I. Križaj-mnenje v Poročilu o N- terminalni sekvenčni analizi). V vzorcu Lv navadnega fazana je bilo tudi aminokislinsko zaporedje: GVQAEDEAVY, ki je identično zaporedju Lv kokoši v variabilnem delu (aminokislina 72-81) pred CDR3 kokoške Lv (Reynaud in sod., 1983). Vrhovi signalov, ki v grafikonu označujejo aminokislina, so bili v tem zaporedju vidno nižji (in drugačni), kot so bili za aminokislina, ki so bile določene v N- terminalnem zaporedju (grafikon sekvenčne analize 3.2.09).

Za Lv diamantnega fazana ni bilo mogoče določiti aminokislinskega zaporedja, ker je bil N-terminus verjetno blokiran (mnenje prof. dr. I. Križaj). Enako verjetno je bil blokiran N-terminus Lv beloglavega jastreba, saj je bil signal šibak in heterogen. Določena so bila 3 zaporedja: GPDVL, DVGE in GXQY, ki pa ob tako šibkih signalih niso zanesljiva in so možne tudi drugačne kombinacije ak v zaporedjih (prof. dr. I. Križaj).

4.4 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG

Nukleotidna zaporedja smo pomnoževali z metodo verižne reakcije s polimerazo s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Za pozitivno kontrolo smo uporabili kokošjo DNA izolirano iz limfocitov B (celična linija DT40).

Z dvema paroma začetnih oligonukleotidov (CONSTANT F1+CONSTANT R1 ter CLF+LIGHT R) smo v ločenih verižnih reakcijah s polimerazo pomnoževali DNA z nukleotidnimi zaporedji, ki kodirajo kLv in tista, ki obdajajo omenjeno regijo. Regija pri kokoši obsega 550 bp in je sestavljena iz: 1- regije na 5' koncu, pred regijo, ki kodira kLv, 2- regije, ki kodira kLv ter 3- regije za stop kodonom na 3' koncu. Na opisan način smo pomnožili nukleotidna zaporedja purana, poljske jerebice ter navadnega fazana. Reakcija pomnoževanja z DNA moskovske rase z začetnima oligonukleotidoma CLF+LIGHT R je uspela, medtem ko reakcija pomnoževanja z DNA pava ni uspela z nobenim parom začetnih oligonukleotidov. Z omenjenim parom (CLF+LIGHT R) začetnih oligonukleotidov smo poskušali pomnoževati še DNA gosi, goloba, sokola selca, lesne sove ter papig (skobčevke ter

sivega žakoja). Slednje reakcije niso uspele, pregled verižnih reakcij s polimerazo pa je prikazan v Prilogi D, Preglednica 14.

S tretjim parom začetnih oligonukleotidov (JOINING F+JOINING R) smo pomnoževali DNA regijo dolgo 154 nukleotidov, ki obsega: 1- regijo na 5' koncu, pred regijo, ki kodira jLv, 2- regijo, ki kodira jLv ter 3- regijo na 3' koncu. Pomnožili smo nukleotidna zaporedja purana, poljske jerebice, navadnega fazana ter pava (določeno je bilo le delno zaporedje pava).

4.4.1 Verižna reakcija s polimerazo

4.4.1.1 Pregled rezultatov verižnih reakcij s polimerazo

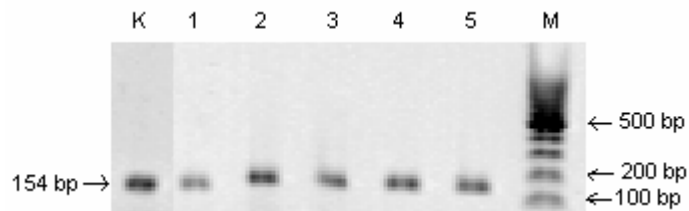
Preglednica 8: Pregled izolacije genomske DNA iz različnih vrst ptic, začetni oligonukleotidi, velikost produktov verižne reakcije s polimerazo, številka zaporedja v GenBank.

Izvor DNA	Uporabljena kombinacija začetnih oligonukleotidov	Velikost produkta verižne reakcije s polimerazo	Št. zaporedja v GenBank
Poljska jerebica (vranica)	CONSTANT F1+ CONSTANT R1	408 bp	FJ 649653**
	CLF+ LIGHT R	547 bp	
	JOINING F+ JOINING R	154 bp	/
Navadni fazan (vranica)	CONSTANT F+ CONSTANT R	404 bp	FJ 649651**
	CLF+ LIGHT R	547 bp	
	JOINING F+ JOINING R	154 bp	/
Puran (celice epitela sinusa)	CONSTANT F1+ CONSTANT R1	399 bp	FJ 649652**
	CLF+ LIGHT R	547 bp	
	JOINING F+ JOINING R	154 bp	/
Kokoš (celična linija DT40)	CONSTANT F1+ CONSTANT R1	399 bp*	/
	CLF+ LIGHT R	550 bp	/
	JOINING F+ JOINING R	154 bp	/
Pav (celice epitela sinusa)	CONSTANT F1+ CONSTANT R1	–	/
	CLF+ LIGHT R	–	/
	JOINING F+ JOINING R	154 bp	/

* Zaporedje kokoši (celična linija DT40) je enako kot na GenBank (M24403), zamenjava ene aminokislina v kLv- polimorfizem že opisan (Reynaud in sod., 1983; Parvari in sod., 1987, 1990). ** Oznake (Accession numbers) zaporedij v GenBank, ki smo jih določili v tej nalogi.

4.4.1.2 Analiza nukleotidnih zaporedij za jLv Ig z metodo verižne reakcije s polimerazo

Zaporedja DNA, ki kodirajo jLv smo pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov JOINING F+JOINING R. Pomnožene regije ustrezajo delu »intervening« DNA, eksonu 3 ter delu introna B kokošnjega gena za Lv Ig (prikazano na Sliki 8).



Slika 11: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov: JOINING F+JOINING R. Steze: K: kontrola; vzorec DNA izolirane iz kokošnjih limfocitov B (celična linija DT40), 1: genomska DNA izolirana iz pava, 2: genomska DNA izolirana iz purana, 3: genomska DNA izolirana iz race, 4: genomska DNA izolirana iz navadnega fazana, 5: genomska DNA izolirana iz poljske jerebice, M: označevalec molekulskih mas DNA; lestvica 1000 bp. Produkt iz kokošje DNA obsega 154 bp (na sliki).

4.4.1.2.1 Nukleotidno zaporedje jLv

Nukleotidna zaporedja, ki vsebujejo tudi zapis za jLv smo poravnali s programom ClustalW, nukleotidno zaporedje kokoši smo vzeli iz podatkovne zbirke Genbank (M24403).

```
Fazan      GGTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACCACCCTGACCG 60
Kokos     GGTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACAACCCTGACCG 60
Jerebica  GGTTTTGCATTGCTCCATATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACCACCCTGACCG 60
Puran    GGTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACAACCCTGACCG 60
          ***** **
Fazan      TCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATTGTGACAT 120
Kokos     TCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATTGTGACAT 120
Jerebica  TCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATTGTGACAT 120
Puran    TCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATTGTGACAT 120
          ***** **
Fazan      TTGGTCGATTTTGGIGATTGGGGGT 147
Kokos     TTTGTCGATTTTGGIGATTGGGGGT 147
Jerebica  TTGGTCGATTTTGGIGATTGGGGGT 147
Puran    TTGGTCGATTTTGGIGATTGGGGGT 147
          ** *****
```

Slika 12: Poravnava zaporedij za joining del Lv (jLv).

Legenda: rumena barva: 5' konec pred jLv, roza: del, ki kodira jLv in temno zelena barva: 3' konec za jLv regijo.

4.4.1.2.2 Analiza nukleotidnega zaporedja jLv

Regijo jLv smo pomnoževali z začetnima oligonukleotidoma: JOINING F+JOINING R. Pomnoževanje je uspelo pri puranu, poljski jerebici, navadnem fazanu ter pavu (delno zaporedje), produkte verižne reakcije s polimerazo smo poslali v sekvenčno analizo. Zaporedja purana, poljske jerebice ter navadnega fazana smo primerjali z zaporedjem kokoši (GenBank, M24403) in jih poravnali s programom ClustalW (Slika 12), poravnava z delnim (111 nukleotidov) zaporedjem pava je prikazana v Prilogi B, na Sliki 19.

Regijo (147 nukleotidov) lahko razdelimo v tri dele: 1- 5' konec pred jLv, 2- del, ki kodira jLv ter 3- 3' konec za jLv.

1. V prvi regiji (29 nukleotidov) so zaporedja kokoši, purana ter navadnega fazana identična, v zaporedju poljske jerebice pa je en nukleotid zamenjan (G→A), omenjeno zaporedje je torej 96.6% identično preostalim zaporedjem.

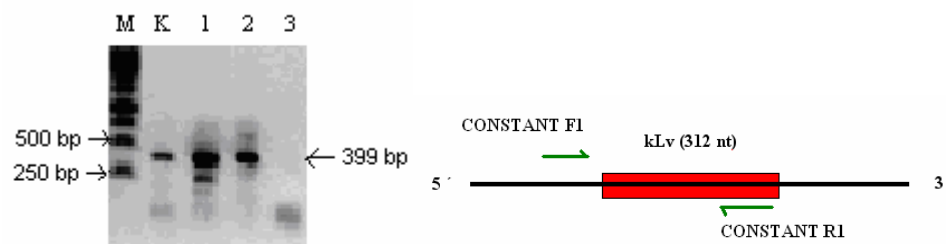
2. Druga regija (39 nukleotidov), to je nukleotidno zaporedje, ki kodira jLv je izmed omenjenih treh regij najmanj ohranjena, vendar vseeno kaže visoko stopnjo identičnosti, saj

so zamenjave nukleotidov samo na treh mestih: dve pri puranu ($T \rightarrow C$, $G \rightarrow A$), ena zamenjava pri fazanu in jerebici ($A \rightarrow C$). Zaporedja vseh štirih omenjenih vrst (konsenzus) so identična v 92.3%. Napovedana aminokislinska zaporedja kokoši, poljske jerebice ter navadnega fazana so identična, pri puranu pa je ena aminokislina zamenjana ($Ala \rightarrow Thr$). Regija kodira 13 aminokislin, ki so pri sestavljeni Lv neposredno pred konstantnim delom Lv (pred kLv).

3. Tretja regija je sestavljena iz 79 nukleotidov, stopnja identičnosti med zaporedji omenjenih štirih vrst ptic pa najvišja: 97.5%.

4.4.1.3 Analiza nukleotidnih zaporedij kLv Ig purana, navadnega fazana in poljske jerebice

Zaporedja DNA, ki kodirajo kLv smo pomnoževali z dvema različnima kombinacijama začetnih oligonukleotidov (CONSTANT F1 in CONSTANT R1 ter CLF in LIGHT R). Pomnožene regije ustrezajo delu introna B, eksonu 4 ter 3' koncu za eksonom 4 kokošjega gena za Lv Ig (prikazano na Sliki 8).

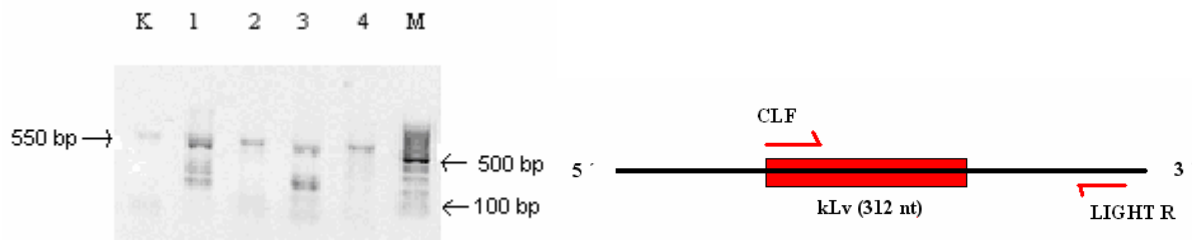


Slika 13:

Levo: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr.

Desno: Shematski prikaz, kateri del gena Lv je bil analiziran.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov: CONSTANT F1+CONSTANT R1. Steze: M: označevalec molekulskih mas DNA; lestvica 1000 bp, K: kontrola: vzorec DNA izolirane iz kokošjih limfocitov B (celična linija DT40), 1: genomska DNA izolirana iz navadnega fazana, 2: genomska DNA izolirana iz poljske jerebice, 3: genomska DNA izolirana iz pava. Produkt iz kokošje DNA obsega 399 bp (na sliki).



Slika 14:Levo: Analiza produktov verižne reakcije s polimerazo v agaroznem gelu z označevanjem z EtBr.

Desno: Shematski prikaz, kateri del gena Lv je bil analiziran.

Kombinacija začetnih oligonukleotidov: CLF+LIGHT R. Steze: K: kontrola: vzorec DNA izolirane iz kokošjih limfocitov B (celična linija DT40), 1: genomska DNA izolirana iz race, 2: genomska DNA izolirana iz purana, 3: genomska DNA izolirana iz navadnega fazana, 4: genomska DNA izolirana iz poljske jerebice, M: označevalec molekulskih mas DNA; lestvica 100 bp. Produkt iz kokošje DNA obsega 550 bp (na sliki).

4.4.1.3.1 Celotno nukleotidno zaporedje kLv

Produkte verižne reakcije s polimerazo prikazane na Slikah 13 in 14 smo poslali na sekvenciranje v podjetje Macrogen (Koreja). Ker je pomnoževanje z DNA kokoši, izolirane iz celične linije limfocitov B DT40 predstavljalo pozitivno kontrolo verižnih reakcij s polimerazo, smo zaporedje (pomnoženo s parom začetnih oligonukleotidov CONSTANT F1+CONSTANT R1), poslali v sekvenčno analizo. Zaporedje moskovske rase je že bilo določeno (GenBank, M25726), zato njene DNA nismo pošiljali na sekvenciranje.

Rezultate sekvenciranja smo naprej preverili (zapisa fasta formatov smo uskladili in preverili z vrhovi posameznih nukleotidnih baz na grafih pdf formata) in nato dobljeni regiji združili, saj sta se na določenem delu nukleotidni zaporedji dobljeni z obema kombinacijama začetnih oligonukleotidov prekrivali. Tako smo dobili informacijo o približno 646-656 bp dolgem delu nukleotidnega zaporedja genomske DNA, natančneje: pri puranu nukleotidno zaporedje obsega 646 bp, pri poljski jerebici 656 bp ter pri navadnem fazanu 654 bp. Urejena nukleotidna zaporedja smo vložili v podatkovno zbirko GenBank, kjer imajo sedaj naslednje oznake: nukleotidno zaporedje poljske jerebice: FJ 649653, navadnega fazana: FJ 649651 ter nukleotidno zaporedje purana: FJ 649652.

Celotno nukleotidno zaporedje je prikazano na Sliki 15, kjer so vse tri regije ustrezno podrčrtane.

Za poravnavo nukleotidnih zaporedij, ki vsebujejo tudi zapis za kLv Ig sem uporabila program ClustalW. Nukleotidno zaporedje kokoši je iz podatkovne zbirke GenBank (M24403). Zaradi lažjega prikazovanja podatkov celotna vrstna imena niso izpisana. V nadaljevanju je prikazana poravnava nukleotidnih zaporedij, mesta ujemanja posameznega nukleotida pri vseh štirih vrstah so pod poravnavo označena z zvezdico (*).

Nadaljevanje slike

Puran	TACATGGCCAGCAGCTACCTGTCACTGACTGCCAGCGACTGGTCAAGTCACGAGACCTAC	348
Jerebica	TACATGGCCAGCAGCTACCTGACACTGACTGCCAGCAACTGGTCGAGCCACGAGACCTAC	357
Fazan	TACATGGCCAGCAGCTACCTGTCACTGTCTGCCAGCGACTGGTCAAGCCACGAGACCTAC	353
Kokos	<u>TATATGGCCAGCAGCTACCTGTCACTGTCTGCCAGCGACTGGTCAAGCCACGAGACCTAC</u>	348
	** *****	
Puran	ACCTGCAGGGTCACACACGATGGCACCCTGTACGAAGACCCTGAAGAGGTCGGAGTGC	408
Jerebica	ACCTGCAAGGTCACACACGAAGGCACCCTGTACGAAGACCCTGAAGAGGTCGGAGTGC	417
Fazan	ACCTGCAGGGTCACACACGATGGCACCTCTATCAGGAAGACCCTGAAGAGGTCGGAGTGC	413
Kokos	<u>ACCTGCAGGGTCACACACAACGGCACCTCTATCAGGAAGACCCTGAAGAGGTCGGAGTGC</u>	408

Puran	TCTTAGTCCCACTGGGGATGCGATGTGAGGACGGTGGTTCCCTCACCCCTCCCTGTCCCTCT	468
Jerebica	TCTTAGTCCCACTGGGGATGCGATGTGAGGATGGTGGTTCCCTCACCCCTCCCTGTCCCTCT	477
Fazan	TCTTAGTCCCACTGGGGATGCGATGTGAGGACGGTGGTTCCCTCACCCCTCCCTGTCCCTCC	473
Kokos	<u>TAA TAGTCCCACTGGGGATGCAATGTGAGGACAGTGGTTCCCTCACCCCTCCCTGTCCCTCT</u>	468
	* *****	
Puran	GGGCCACTGCTGGTGGCAGCAGCCCCACTTCCCACTCAGATGTCCCCACCGTGCCCC	528
Jerebica	GGGCCACTGCTGGTGACAGCAGCCCCACTTCTCACTCAGATGTTCCCCACCATGCCCC	537
Fazan	GGGCCACTGCTGGTGGCAGCAGCCCCACTTCCCACTCAGATGTCTCCCACCGTGCCCC	533
Kokos	<u>GGGCCGCTGCTGGTGGCAGCAGCCCCACTTCCCACTCAGATGTCCCCACCGTGCCCC</u>	528

Puran	ACCACCCACCTCTGCCTGTGCGCTCCTCTTGCGCCATCCCTCCAGATGTCACATTAATA	588
Jerebica	ACCACCCACCTCTGCCTGTGCGCTCCTCTTGCGCCATCCCTCTAGATGTCACATTAATA	597
Fazan	ATCACCCACTTCTGCCTGTGCGCTCCTCTTGCGCCATCCCTCCAGATGTCACATTAATA	593
Kokos	<u>ATCACCCACCTCTGCCTGTGCGACTCCTCTTGCGCTCATCTCTCCAGGTGTCACATTAATA</u>	588
	* *****	
Puran	AACATGACACTGAACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTTCG	643
Jerebica	AACATGACACTGAACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTTCG	652
Fazan	AACATGACACTGAACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTTCG	648
Kokos	<u>AACACGACACTGAACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTTCG</u>	643
	**** *****	

Slika 15: Poravnava nukleotidnih zaporedij za kLv Ig (ClustalW).

Zaporedje vključuje del introna B (M24403), ekson 4 (kLv) in del regije na 3' koncu za eksonom 4. Prvi nukleotid v zaporedju kokoši ustreza 4422. nukleotidu v zaporedju, ki kodira Lv v podatkovni zbirki GenBank (M24403). Legenda: z zeleno barvo je podčrtana regija 5' konca pred kLv, z rdečo kLv ter modro barvo regija 3' konca za stop kodonom.

4.4.1.3.2 Analiza nukleotidnega zaporedja kLv

Analiza nukleotidnega zaporedja kLv se nanaša na Sliko 15.

1. Prvi del zaporedij (regija 5' konca pred kLv) je najbolj heterogen, to je regija 106 nukleotidov pri jerebici, pri ostalih vrstah pa glede na delecije ustrezno manj: pri puranu 97, pri navadnem fazanu 102 ter pri kokoši 94 nukleotidov.

Zaporedja vseh štirih vrst ptic (purana, poljske jerebice, navadnega fazana ter kokoši) so si identična v 55.6%. Nadalje bodo v tej regiji nukleotidi označeni glede na zaporedje poljske jerebice, ki v tej regiji nima delecije.

Puran ima najprej delecijo 7-ih nukleotidov (25.-31.), ostale vrste imajo na tem mestu ohranjeno zaporedje: TACAGA(T/G) (kokoš). Sledi regija (40.-51.), v kateri ima puran delecijo 2 nukleotidov (42. in 43.), navadni fazan delecijo 4 nukleotidov (40.-43.) ter kokoš delecijo 12 nukleotidov (40.-51.).

2. Sledi regija, ki kodira kLv, v kateri so si zaporedja identična v 87%. V tej regiji najdemo delecijo 3 nukleotidov: GCC (1 aminokislina) pri puranu, poljski jerebici ter navadnem fazanu. Celotna regija obsega 312 nukleotidov pri puranu, poljski jerebici, navadnem fazanu ter kokoši, saj imajo zaporedja purana, poljske jerebice ter navadnega fazana kljub deleciji treh nukleotidov, zaporedje na koncu kLv daljše za tri nukleotide (TAG). Pri kokoši se stop kodon namreč konča 3 nukleotide prej, kot pri preostalih preučevanih vrstah ptic.

3. Zadnji del zaporedja, to je regija 3' konca za kLv (obsega 229 nukleotidov) kaže najvišjo stopnjo identičnosti pri vseh štirih vrstah: 89.5%. Ta regija je najbolj homogena in v njej ni delecij oz. insercij.

4.5 ANALIZA AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ LAHKIH VERIG

4.5.1 Analiza napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv

Ob poravnavi napovedanih aminokislinskih zaporedij (13 aminokislin) za jLv vidimo, da imajo kokoš, navadni fazan in poljska jerebica identična zaporedja (GIFGAGTTLTVLG), puran pa ima zamenjano 5. aminokislino (zaporedje purana: GIFGTGTTLTVLG).

4.5.2 Analiza napovedanih aminokislinskih zaporedij kLv

Pri poravnavi napovedanih aminokislinskih zaporedij za kLv opazimo, da navadni fazan, poljska jerebica ter puran nimajo asparagina (N), ki je prisoten pri kokoši. Na ostalih mestih (mesta, ki niso označena z zvezdico) gre za posamezne zamenjave (substitucije) aminokislin. Vendar so zaporedja enako dolga in vključujejo 103 aminokislino. Zaporedje purana, navadnega fazana in poljske jerebice se končuje s serinom (KRSECSS), ki manjka v zaporedju kokoši (zaporedje so konča: KRSEC).

Ob poravnavi napovedanega aminokislinskega zaporedja kLv (ni prikazano na sliki) kokoši (DNA izolirana iz celične linije DT40) smo opazili substitucijo 90. aminokislino N (prikazano na Sliki 16) (M24403)/D (DT40). Ta polimorfizem je bil že opisan (Reynaud in sod., 1983; Parvari in sod., 1987; 1990).

Primerjava aminokislinskih zaporedij Lv določenih v preteklih raziskavah (Grant in sod., 1971) in napovedanih zaporedij jLv in kLv te raziskave je prikazana na Sliki 16.

```

Kokos (Grant in sod., 1971)      LTVLGQPKVAPTITLFPSSKEELNEATKATLVCTG 35
Puran (Grant in sod., 1971)   LTVLGQPKVAPTITLFPSSKEELDQ-NKATLVCTG 34
                                *****
Kokos                          GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITLFPSSKEELNEATKATLVCLINDFYPSFVTVDWVIDGS 60
Fazan                          GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITLFPSSKEEL-ESTKATLVCLINDFYPSFVTVDWVIDGS 59
Jerebica                       GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITLFPSSKEEL-EQGKATLVCLINDFYPSFVTVEWLVDGS 59
Puran                          GIFGTGTTTLTVLGQPKVAPTITLFPSSKEEL-DQNKATLVCLISDFYPSFVTVEWLVDGS 59
                                ****:*****:***** : *****:*****:***

Kokos                          TRSGETTAPQRSNSQYMASSYLSLSASDWSSHETYTCRVTHDGTSTITKTLKRSEC- 116
Fazan                          TRSGETTAPQRSNSQYMASSYLSLSASDWSSHETYTCRVTHDGTSTITKTLKRSECS 116
Jerebica                       TQRGETTAAQRSNSQYMASSYLTLTASNWSSHETYTCRVTHEGTTVTKTLKRSECS 116
Puran                          TRKGETTTPAQRSNSQYMASSYLSLTASDWSSHETYTCRVTHDGTAVTKTLKRSECS 116
                                *: ****,*****:***:*****:***:***:*****

Kokos (Grant in sod., 1971)     LTASDWESHTSYSCRVTHDGTSTITKTLKRSEC- 32
Puran (Grant in sod., 1971)   LTASDWESHTSYSCRVTHDGTSTATKTLKRSECS 33
                                *****
    
```

Slika 16: Primerjava dobljenih napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv ter kLv navadnega fazana, poljske jerebice ter purana, z zaporedjem kokoši (GenBank, M24403).

Zgoraj in spodaj poravnava delnih zaporedij kokoši in purana (Grant in sod., 1971). Legenda: modra barva: jLv, rdeča barva: kLv. V zelenem okvirju je označena 90. aminokislina kLv (N-asparagin), kjer je v zaporedju kokoši (celična linija DT40) zamenjana aminokislina: D- aspartatna kislina. Prva aminokislina kLv (zaporedje QPKVA...) v prikazanem zaporedju je 104. aminokislina v Lv kokošnjih imunoglobulinov (Reynaud in sod., 1983).

Napovedani aminokislinski zaporedji združenih obeh regij jLv in kLv kokoši in fazana sta najbolj podobni, sta identični v 95.7% (111 od skupno 116 aminokislina), medtem ko sta zaporedja purana in poljske jerebice identični v 89.7% (104 od skupno 116 aminokislina).

Preglednica 9: Odstotki podobnosti zaporedij: A- nukleotidnih, B- aminokislinskih.

A \ B	Jerebica		Fazan		Puran		Kokoš		Raca	
	jLv	kLv	jLv	kLv	jLv	kLv	jLv	kLv	jLv	kLv
Jerebica			98%	92%	98%	94%	98%	88%	84%	76%
Fazan	100%	84%			97%	93%	99%	92%	85%	76%
Puran	92%	89%	92%	86%			97%	91%	82%	76%
Kokoš	100%	83%	100%	96%	92%	85%			85%	75%
Raca	92%	65%	92%	67%	85%	66%	92%	65%		

Za poravnavo nukleotidnih zaporedij smo uporabili program ClustalW ter znani zaporedji za kLv kokoši (GenBank, M24403) ter moskovske race (M25726).

Primerjava dobljenih nukleotidnih zaporedij jLv purana, navadnega fazana ter poljske jerebice kaže, da so ta veliko bolj sorodna z zaporedjem kokoši (97%, 99% oz. 98% identičnost zaporedij) kot zaporedjem, za jLv race (82%, 85% oz. 84% identičnost zaporedij).

Prav tako so zaporedja kLv omenjenih ptic bolj sorodna kokošnjemu zaporedju (91%, 92% in 88% identičnost zaporedij) kot zaporedju za kLv race (76% identičnost zaporedij). Poravnava z ustreznim aminokislinskim zaporedjem race je prikazana v Prilogi B, na Sliki 20.

Če upoštevamo obe nukleotidni regiji (regijo okrog in vključno z jLv ter kLv), so si zaporedja kokoši, purana, poljske jerebice ter navadnega fazana (konsenzus) (ni prikazano v preglednici) identična v 86% (689 od skupno 802 nukleotidov), 81% v celotnem (združenem) napovedanem aminokislinskem zaporedju za jLv in kLv (94 od skupno 116 aminokislin) in 62% identična s celotnim napovedanim aminokislinskim zaporedjem race mlakarice (GenBank, S49449) (73 od skupno 118 aminokislin).

4.5.3 Analiza napovedanih in dejanskih aminokislinskih zaporedij Lv

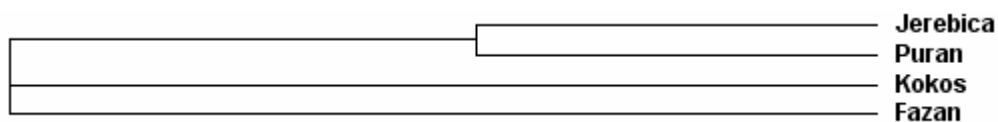
Skupaj z N- terminalnim zaporedjem navadnega fazana (19 aminokislin) ter delnim aminokislinskim zaporedjem variabilnega dela Lv (10 aminokislin), jLv (13 aminokislin) ter kLv (103 aminokislina) smo določili 148 aminokislin Lv, kar predstavlja približno 70% celotne Lv navadnega fazana.

Sestavljeni deli Lv (jLv in kLv) (prikazano na Sliki 16) purana in poljske jerebice vsebujejo neprekinjeno zaporedje 116 aminokislin in s tem blizu 60% celotnega aminokislinskega zaporedja Lv omenjenih dveh vrst ptic.

4.5.4 Filogenetski odnosi med preučevanimi pticami

Za prikaz filogenetskih odnosov med preučevanimi pticami smo s programskim orodjem ClustalW naredili kladograme.

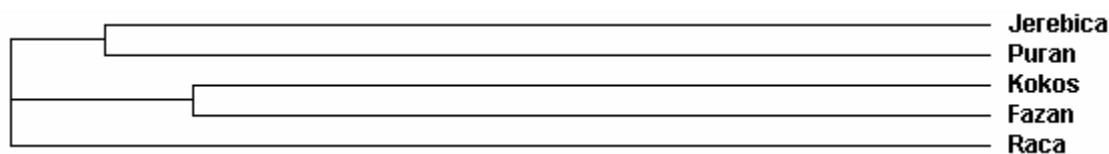
Pri poravnavi napovedanih aminokislinskih zaporedij združenih regij jLv ter kLv galiformnih ptic (poljska jerebica, puran, navadni fazan, kokoš) je topologija kladograma sledeča: poljska jerebica in puran sta sestrski skupini znotraj družine Phasianidae (Slika 17) (zaporedje kokoši z GenBank, M24403). Enako topologijo drevesa dobimo, če poravnamo nukleotidna zaporedja.



Slika 17: Kladogram poravnave napovedanih aminokislinskih zaporedij (ClustalW) za jLv+kLv galiformnih ptic.

Če v poravnavo dodamo zaporedje moskovske race (GenBank, M25726) (Slika 18) se topologija kladograma poravnave aminokislinskih zaporedij znotraj galiformnih ptic nekoliko

spremeni, tudi kokoš in navadni fazan sta namreč prikazana kot sestrski skupini, medtem ko jerebica in puran ostajata sestrski skupini, kot na prejšnem kladogramu (Slika 17).



Slika 18: Kladogram poravnave napovedanih aminokislinskih zaporedij (ClustalW) jLv+kLv galiformnih ptic ter rase (GenBank, S49449).

Programsko orodje združuje taksone na osnovi metode združevanja sosedov (angl “neighbor-joining”). Zaporedje rase mlakarice (*Anas platyrhynchos*) je prikazano kot zunanja skupina (najmanj sorodno zaporedje).

4.6 ANALIZA LASTNOSTI PROTEINOV Z BIOINFORMACIJSKIMI METODAMI

4.6.1 Napoved teoretično najbolj antigene regije

Teoretično najbolj antigeno regijo na delu, ki združuje jLv ter kLv smo določili s programskim orodjem Antheprot (Antigenicity by Parker), ki je dostopno na spletnih straneh. Najbolj antigena regija je na delu od 55. do 76. aminokislinskega ostanka tega dela Lv.

Zaporedje poljske jerebice izstopa na delu: QR (zaporedje prikazano v Preglednici 10), na mestu Q (glutamin): polarna, nevtralna aminokislina, preostale vrste ptic imajo na tem mestu R (arginin), ki je polarna, bazična aminokislina. Naslednja aminokislina je R (arginin), kokoš in navadni fazan imata na tem mestu aminokislino S: (serin, polarna nevtralna), puran pa K (lizin, polarna bazična).

Preglednica 10: Določitev teoretično najbolj antigene regije

Izvor proteina (jLv+kLv)	Teoretično najbolj antigena regija (55-76 ak)
Navadni fazan	V IDGSTRS GETTAPQRQSNSQY
Poljska jerebica	LVDGSTR <u>Q</u> GETTAAQRQSNSQY
Puran	LVDGSTRKGETT PAQRQSNSQY
Kokoš	V IDGSTRSGETT A PQRQSNSQY

4.6.2 Teoretične molske mase in izoelektrične točke proteinov

S programskim orodjem ExPASy smo izračunali teoretične molske mase in izoelektrične točke proteinov (jLv (13 aminokislin) in kLv (103 aminokislina)).

Preglednica 11: Teoretična molska masa in izoelektrična točka proteinov (jLv+kLv) (ExPASy).

Vrsta ptice/Izvor proteina	Teoretična izoelektrična točka jLv+kLv	Teoretična molska masa jLv+kLv
Navadni fazan	5.57	12 538.98 Da
Poljska jerebica	6.11	12 578.11 Da
Puran	6.10	12 621.13 Da
Kokoš	6.09, cela Lv: 5.89	12 549.02 Da, cela Lv: 24 168.86 Da

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Kokoši so predmet imunoloških študij že dobrih 90 let (od leta 1918) (po: Leslie in Clem, 1969), vendar o strukturi Ig ptic in njihovih Lv (poleg zaporedja kokoši dveh različnih vrst rac ter delnih aminokislinskih zaporedij purana in goloba), do sedaj ni bilo veliko znanega.

V raziskavi smo določili nukleotidna zaporedja, ki kodirajo konstantni del lahke verige (kLv) purana, navadnega fazana ter poljske jerebice ter zaporedja, ki kodirajo jLv purana, navadnega fazana, poljske jerebice ter pava (delno zaporedje). Zaporedja kLv smo poslali v podatkovno zbirko GenBank, kjer so sedaj pod številkami (accession numbers): FJ 649651, FJ 649652, FJ 649653. Poleg tega so bile v okviru te naloge določena delna aminokislinska zaporedja Lv Ig fazana.

V preteklosti so že bile objavljene (Mockett, 1986; Narat in sod., 2004; Leslie in Benedict, 1970; Van Nerom, 1997) reakcije mišjih mAb (in poliklonskih protiteles) proti kokošjim Ig, ki so reagirala tudi z Ig purana, fazana, pava.

MAb, ki prepoznavajo lahke verige so še posebej uporabna, saj pri pticah prepoznajo Ig vseh razredov (IgG, IgA in IgM). Za razliko od sesalskih Lv je pri pticah le en tip Lv, ki je bližji sesalskemu Lv tipa λ , kot tipa κ (Grant in sod., 1971).

V raziskavi smo z mAb 3C10, ki je v testu DIBA (Narat in sod., 2004) specifično prepoznavalo lahke verige serumskih Ig purana, fazana, (domnevno tudi vrabca) ni pa prepoznavalo serumskih Ig pava, papige in Ig izoliranih iz rumenjaka prepelice, race in noja, testirali še serume 15 vrst ptic, katerih reakcije še niso bile opisane.

5.1.1 ANTIGENSKA SORODNOST LAHKIH VERIG IMUNOGLOBULINOV PTIC

V preteklosti so pri preiskavah sorodnosti kokošjih Ig z Ig drugih vrst ptic uporabljali različne tipe seroloških testov in specifična poliklonska protitelesa proizvedena v kuncih ali pticah (Leslie in Benedict, 1970; Ch'ng in Benedict, 1981). Uvedba tehnologije proizvodnje monoklonskih protiteles pa je omogočila pridobivanje zelo specifičnih protiteles, ki navadno prepoznavajo en sam epitop in so zelo primerni za natančne analize antigenih determinant, ki so skupne Ig oziroma njihovim podenotam. Spremenile so se tudi tehnike seroloških testov in se vse več uporabljajo različni encimskoimunski testi, kot so ELISA, DIBA, imunobloti (western blot) in drugi (Mockett, 1986; Narat in sod., 2004).

S serološkimi analizami ptičjih Ig lahko vzpostavimo prvi, hiter pregled filogenetskih odnosov, ki jih lahko potrdimo in bolj natančno opredelimo z določitvijo DNA zaporedij genov in aminokislinskih zaporedij proteinov (Ch'ng in Benedict, 1981).

5.1.1.1 Lahke verige imunoglobulinov različnih redov/družin/rodov/vrst ptic imajo podobne antigenske determinante

Znano je bilo, da imajo purani in različni rodovi fazanov na Lv antigenske determinante, ki so ozko sorodne kokošjim (Ch'ng in Benedict, 1981), manj sorodne pa so Lv prepelice (Leslie in Benedict, 1970). Objavljeno je bilo tudi (Narat in sod., 2004), da mAb 3C10, ki smo ga uporabili v tej raziskavi, reagira z Lv Ig kokoši, purana in fazana. Kot referenčno mAb za Lv smo imeli mAb CH-31, ki po zagotovitvi proizvajalca (Sigma) prepozna Lv kokoši (in purana), kar je bilo potrjeno v predhodni raziskavi (Narat in sod., 2004). Reakcije mAb 3C10 opažene v tej raziskavi so potrdile, da prepozna Lv Ig kokoši, purana in navadnega fazana (Slika 9). Poleg tega so z omenjenim mAb reagirale Lv več rodov fazanov, tragopana, beloglavega jastreba. Verjetno mAb 3C10 reagira tudi z Lv pava, vendar le, če so še povezane s celo molekulo Ig. V nekaterih primerih je bilo opaženo, da to mAb reagira v DIBA testu (npr.: sončna aratinga), ne reagira pa v imunoblotu. Na splošno so bile reakcije mAb 3C10 in CH-31 s serumi ptic podobne, vendar je drugi pokazal pozitivne reakcije z več različnimi Ig (in Lv) ptic. Izjema je bil serum pegatke, ki je v DIBA testu in v imunoblotu z nereduciranimi Ig reagiral le z mAb 3C10.

5.1.1.1.1 Reakcije mAb 3C10 in CH-31 z vzorci serumov ptic v DIBA testih

MAb 3C10 je bilo v DIBA testu uporabljeno že v predhodni raziskavi, v kateri so bili preiskani serumi ali rumenjaki 10-ih vrst ptic (Narat in sod., 2004). DIBA test je zelo občutljiv test in v tej nalogi je vzorec kokošjega seruma močno reagiral z mAb 3C10 tudi v redčini 1:100000 ali več (ni prikazano v preglednici). Glede na skupno povprečno koncentracijo imunoglobulinov IgG, IgA, IgM v kokošjem serumu (~10 mg/ml) ter redčino (1:100000 in volumen 2.5 µl) mAb 3C10 reagira tudi, če je kokošjih Ig v redčini vzorca zelo malo (nanogramske količine). V zelo visokih redčinah (1:25000 ali višje) so z njim relativno močno reagirali tudi vzorci serumov nekaterih rodov fazanov (navadni, diamantni, Swinhojev) in beloglavega jastreba.

Tudi mAb CH-31 močno reagira z nižjimi koncentracijami kokošjih in Ig drugih vrst ptic, kot je to navedeno (podatek proizvajalca Sigma: v ELISA testu s kokošjimi IgG (10 µg/ml) je minimalna delovna redčina mAb CH-31 1:10000). Taka koncentracija kokošjih IgG je, če je kokošji serum redčen 1:500 ali 1:1000. Dejansko pa mAb CH-31 v DIBA testu močno reagira tudi pri najmanj 100 krat višji redčitvi kokošjega seruma.

Kot v objavljeni raziskavi (Narat in sod., 2004) tudi tokrat mAb 3C10 v DIBA testu ni reagiralo s serumom pava, v redčinah seruma 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400 ter 1:25600, čeprav prepozna Ig istega seruma, če so protitelesa vezana na specifičen antigen, npr.: na nativne kolonije *Mycoplasma gallisepticum* (Benčina in sod., 2003). Izgleda, da v tem primeru postane »dostopen« epitop, ki je v testu DIBA »nekako skrit« in se mAb 3C10 ne more vezati. Epitop za mAb 3C10 se »odkrije« na Ig pava tudi po elektroforezi in prenosu IgG na membrano, ki je nato »blokirana« v 0.5% PBST, vendar Lv ne reagirajo, če so ločene od Tv. Reakcije Lv so prikazane na Sliki 9.

Edino pri testih seruma pegatke je mAb 3C10 pokazalo reakcije, ki jih ni bilo, če je bil uporabljen mAb CH-31. MAb 3C10 je dal v DIBA testu dokaj intenzivno reakcijo, če je bil vzorec seruma redčen 1:400, mAb CH-31 pa ni reagiral niti pri redčini seruma 1:100. Ta razlika se je pokazala tudi, če so se protitelesa pegatke vezala na specifičen antigen (proteine bakterije *O. rhinotracheale*) (Zorman-Rojs in sod., 2000). V takem testu je bila encimskoimunska reakcija pozitivna z uporabo mAb 3C10, ne pa, če je bil uporabljen mAb CH-31, ki se ne veže na Ig pegatke (Benčina D.- ustna informacija).

Nasprotno pa mAb 3C10 ni reagiralo z vzorci seruma sijajnega fazana (rod *Lophophorus*), s katerim je dobro reagiralo mAb CH-31, ne samo v DIBA, temveč tudi v »imunoblotu« z »nereduciranimi« Ig.

Da različni rodovi fazanov (*Phasianus*, *Chrysolophus*, *Lophura*) kažejo različne križne reaktivnosti IgG s kokošjim serumom proti fazanu (chicken anti-CRN pheasant serum) sta že leta 1981 objavila avtorja Ch'ng in Benedict, pri čemer je serum navadnega fazana (rod *Phasianus*) bolje reagiral kot seruma zlatega (rod *Chrysolophus*) in sijajnega fazana (rod *Lophophorus*).

V testu DIBA so reakcije mAb 3C10 sledečih ptic iz družine Phasianidae torej pričakovane: močni reakciji serumov navadnega, diamantnega ter še vedno močna reakcija Swinhojevega fazana. Omenjeni fazani (trije različni rodovi) so med seboj zelo sorodni (glede na ostale ptice iz družine Phasianidae). MAb 3C10 je pri vzorcih fazanjih serumskih Ig najslabše reagiralo z vzorci seruma sijajnega fazana.

Preiskani serumski vzorci pripadajo štirim različnim rodovom fazanov: *Phasianus*, *Chrysolophus*, *Lophophorus* ter *Lophura*. Med njimi gre za različne filogenetske odnose, saj literatura (Bush in Strobeck, 2003) na osnovi molekularnih študij (cytokrom b) navaja rodova *Phasianus* (navadni fazan) ter *Chrysolophus* (diamantni fazan) kot najbolj sorodna, medtem ko naj bi bil rod *Lophura* še vseeno filogenetsko bliže obema rodovoma kot rod *Lophophorus*, ki je precej bolj oddaljen (tudi bolj od tragopana).

Reakcija seruma pegatke z mAb 3C10 (CH-31 pa s serumom pegatke ni reagiral) se sklada s filogenijo saj sodi pegatka glede na molekulske in morfološke študije izven predpostavljene družine Phasianidae, medtem ko so puran, prepelica, vsi rodovi fazanov, jerebica in pav po morfoloških (Dyke in sod., 2003) in molekularnih znakih (Kriegs in sod., 2007) umeščeni znotraj družine Phasianidae, torej so sorodnejši kokoši. Glede na filogenetsko uvrstitev pava nas informacija, da mAb 3C10 v DIBA ne reagira s serumskimi Ig nekoliko preseneča, vendar je bilo to že opisano (Narat in sod., 2004). MAb 3C10 prepoznavajo samo nativno (celo) molekulo Ig pava, vezano na antigen, ne prepozna pa Lv, če je ločena od Tv. V primeru pava je sorodnost Lv pava in kokoši bolje pokazalo mAb CH-31 (Slika 10 steza 5).

Gosja protitelesa ne reagirajo z mAb 3C10. Rezultat je pričakovan, saj je gos od kokoši evlucijsko zelo oddaljena: s kokošjo ima zadnjega skupnega prednika pred približno 90

milijoni let, in spada v red Anseriformes znotraj nadreda Galloanseriformes. Monoklonska protitelesa mAb 3C10 prav tako niso reagirala s serumom goloba. To je skladno s pričakovanji, saj je le-ta izmed omenjenih vrst ptic evolucijsko najbolj oddaljen od kokoši in ima, verjetno aminokislinsko zaporedje na prepoznavanem epitopu drugačno od kokoši, fazanov in purana.

Po raziskavi, ki je pokazala sorodnost antigenskih determinant Lv, smo se odločili določiti nukleotidna zaporedja konstantnih delov Lv (ki so visoko ohranjena tudi znotraj nadreda Galloanseriformes- GenBank, BLAST, M24403, M25726) za določitev strukture in podobnosti Lv Ig ptic v smislu signifikantnih molekularnih znakov za izgradnjo molekularnih filogenetskih dreves.

Iz dosedanjih molekularnih študij (molekularno osnovanih filogenetskih dreves na podlagi insercij retotranspozonov (Kriegs in sod., 2007) ter cytokroma b (Bush in Strobeck, 2003), ki uvrščajo jerebico taksonomsko blizu preostalih taksonov, ki so v testu DIBA z mAb 3C10 ter referenčnimi CH-31 reagirali močno pozitivno, smo domnevali, da je homologno (ter evolucijsko dobro ohranjeno) tudi zaporedje konstantnega dela Lv Ig pri jerebici, katere serum z mAb 3C10 ter referenčnimi mAb CH-31 ni reagiral, domnevno zaradi drugačnega aminokislinskega zaporedja Lv jerebice. Uspela verižna reakcija s polimerazo (prikazano v Preglednici 8) je domnevo o sorodnosti potrdila, prav tako tudi rezultati sekvenciranja in poravnave zaporedij.

Močne pozitivne reakcije serumskih Ig z mAb 3C10 in referenčnim CH-31 beloglavega jastreba ter pozitivne reakcije serumskih Ig sončne aratinge so nekoliko presenetljive, saj ujed (Falconiformes) ter papig (Psittaciformes), med katere sodita preučevani vrsti, taksonomsko ne uvrščamo blizu reda Galliformes. Napovedanega aminokislinskega zaporedja njunih Lv ni bilo mogoče določiti, ker razen vzorcev serumov nismo imeli drugega materiala (za izolacijo DNA) teh vrst ptic. Skladno s filogenijo pa mAb 3C10 ter CH-31 niso reagirali s preostalimi serumskimi Ig ptic, ki jih poleg sončne aratinge prav tako uvrščamo v red papig, are in kakaduja.

MAb 3C10 ter CH-31 prav tako nista reagirali s serumskimi vzorci bele štoklje. Tudi reda močvirnikov (Ciconiiformes), v katerega uvrščamo testirano ptico kladisti ne razvrščajo kot sorodno galiformnim (ali galoanseriformnim) pticam.

5.1.1.1.2 Reakcije mAb 3C10 v imunoblotih

Poleg že opisanih reakcij mAb 3C10 z Lv kokoši in navadnega fazana (Narat in sod., 2004), sem ugotovila tudi relativno močne reakcije z Lv purana, diamantnega in Swinojevega fazana, tragopana in beloglavega jastreba. Čeprav je zelo verjetno, da tudi pri njih prepozna epitop na Lv pa je mAb 3C10 s serumskimi Ig pava in pegatke reagiralo le, če Ig niso bili tretirani z β -ME. Močna reakcija Lv pava z mAb CH-31 kaže na to, da mAb 3C10 in CH-31 prepoznavata dva različna epitopa na Lv Ig ptic (Slika 9 in 10). MAb 3C10 v »imunoblotih« ni reagiral z nobenim proteinom seruma sončne aratinge, čeprav so bile reakcije v DIBA testu relativno intenzivne (pri redčini seruma 1:1000). Nasprotno, mAb CH-31 je v imunoblotih reagiral z Ig aratinge, vendar ne z Lv, če so bile te ločene od Tv po reakciji z β -ME.

5.1.1.1.3 Kje na lahki verigi lahko leži epitop za mAb 3C10?

Čeprav ni bilo mogoče dokazati reakcije mAb 3C10 z Lv (pri reduciranih Ig) pa reakcije mAb 3C10 s celimi molekulami Ig (Lv niso bile ločene od Tv) pava, pegatke, nakazujejo, da je verjetno na serumskih Ig naštetih vrst epitop za mAb na Lv. Pri pavu je mAb CH-31 dobro prepoznavalo Lv ločeno od Tv, kar kaže na to, da ti dve mAb reagirata z različnima antigenskima determinantama na Lv Ig ptic.

Analize rezultatov imunoblotov in primerjave z reakcijami mAb CH-31 potrjujejo trditev, da mora biti epitop za mAb 3C10 na Lv Ig ptic (Narat in sod., 2004). Glede na specifičnost njegovih reakcij in znana zaporedja N- terminalnega dela Lv (prvih 6 aminokislin identičnih pri kokoši, puranu, golobu in raci- ALTQPV) (Suzuki in Lee, 2003), mAb pa niso v nobenem izmed encimskoimunskih testov reagirali s serumskimi Ig goloba ali race, ni verjetno, da bi bil epitop za mAb 3C10 v tem delu Lv. Nasploh je malo verjetno, da bi bil njegov epitop v variabilnem delu Lv, ki se veže na "antigen" (v tej regiji so CDR1, CDR2, CDR3). Zlasti v regijah CDR1 in CDR2, se aminokislinsko zaporedje močno spreminja (insercije, delecije in zamenjave aminokislin) pri kokošnjih Ig (Parvari in sod., 1987; 1990) zato je malo verjetno, da bi bili epitopi za mAb 3C10 in CH31 na tem delu molekule Lv.

Prav tako ni verjetno, da bi bil epitop v j (joining) delu Lv, saj so aminokislinska zaporedja enaka pri kokoši in jrebici (GIFGAGTTLTVLG), medtem, ko vzorci Ig jrebice v nobenem testu (DIBA, imunobloti) niso reagirali z mAb 3C10.

Še najbolj se zdi verjetno, da je epitop za mAb 3C10 (in tudi za mAb CH-31) v konstantnem delu Lv, ki pri kokoši Lv obsega aminokislino od 104-206 (Reynaud in sod., 1983). Obe mAb namreč prepoznavata tudi nativna protitelesa, če so vezana na specifične antigene (protitelesa kokoši, različnih rodov fazanov, purana, pava in verjetno beloglavega jastreba).

Malo je verjetno, da je epitop za mAb 3C10 (ali CH-31) v prvem delu kLv, saj v tem delu aminokislinsko zaporedje jerebice (z izjemo mesta na katerem je pri kokoši insercija 1 aminokislino) identično zaporedju kokoši, mAb pa ne reagira z Lv jerebice.

Epitop je verjetno pred C- terminalnim delom Lv, saj ima ta del Lv pri fazanu, navadnem puranu in poljski jerebici zadnjih 10 aminokislin enako zaporedje: TKTLKRSECS (Slika 16), vendar pa mAb 3C10 (in tudi ne mAb CH-31) nista reagirala z Ig jerebice.

Ocena zaporedja, ki je teoretično najbolj »antigena« v konstantnem delu Lv kokoši, purana, fazana in jerebice kaže na isto regijo Lv. Ta se nahaja med aminokislina 55-76 (Anthept, Antigenicity by Parker). Še bolj natančna analiza aminokislinskega zaporedja te regije kaže na mesto, kjer bi bil lahko epitop za mAb 3C10/ ali mAb CH-31. Delno aminokislinsko zaporedje pri kokoši in fazanu je enako (-DGSTRSGETT) med tem, ko je pri jerebici -DGSTQRGETT. Za potrditev take domneve, bi bilo treba pokazati, da peptid s takim aminokislinskim zaporedjem (kokoši) res reagira z mAb 3C10, medtem ko peptid z zaporedjem jerebice ne veže mAb 3C10.

Za potrditev, da mAb 3C10 reagira s kLv, bi potrebovali ustrezen rekombinantni protein ali fragment Lv dobljen s proteolizo. Za natančno mapiranje epitopa bi morali postopek načrtovati, dobiti sintetične peptide (~10-15 aminokislin), ki bi ustrezali zaporedju kLv in bi se njihova zaporedja »prekrivala«. Pojavlja se tudi vprašanje ali je epitop za mAb 3C10, t.i. »linearni« epitop. Pri takem epitopu je za vezanje mAb odločilno zaporedje 5-6 aminokislin. Epitop bi lahko bil "konformacijski", pri slednjem je pomembna pravilna konformacija (gubanje- zvijanje) proteina, ki približa posamične aminokislino, ki na ta način predstavljajo vezišče (epitop) za mAb.

Nekatere reakcije tega mAb npr. pri vzorcih serumov purana in pegatke, so bile odvisne od tega, v kakšnem testu je bilo mAb uporabljeno. MAb 3C10 je prepoznavalo pavje Ig vezane na antigen, ni pa reagiralo v testu DIBA z vzorcem seruma pava. Poleg tega je mAb 3C10 v

imunoblotu močno reagiralo s celimi Ig pava, nasprotno pa ni bilo pozitivne reakcije reakcije z mAb 3C10, če so bili Ig ločeni na Tv in Lv (redukcija z uporabo β -ME).

5.1.2 DOLOČITEV ZAPOREDIJ kLv PRI PURANU, FAZANU IN JEREBICI

5.1.2.1 Primerjava nukleotidnih zaporedij

Predhodno so bila izmed zaporedij genov ptic, znana le zaporedja, ki določajo Lv kokoši (GenBank, M24403) moskovske race (GenBank, M25726) ter race mlakarice (GenBank, X82069). Za določitev takega zaporedja je potreben poseben pristop, saj je regija v genomu prekinjena z introni in regulatornimi zaporedji in obsega 4367 nukleotidov. Za določitev celotnega nukleotidnega zaporedja Lv bi morali iz ustreznih celic izolirati zelo kvalitetno RNA (mRNA), prepisati (z RT-PCR) v cDNA in pomnožiti ustrezen odsek DNA za določitev nukleotidnega zaporedja. Pri tem je treba upoštevati, da genska konverzija ustvarja zaporedja, ki se v variabilnem delu močno razlikujejo, zlasti v predelih Lv, ki so označeni kot CDR1, CDR2 in CDR3 (Parvari in sod., 1987; 1990; Benatar in sod., 1992). Za določitev natančnega zaporedja Lv, bi bilo potrebno kloniranje in določanje zaporedij za posamezne klone.

Zato smo se v nadaljevanju odločili, da iz genomske DNA pridobimo z uporabo metode verižne reakcije s polimerazo, le zaporedje, ki določa konstantno regijo Lv (kLv) in del, ki sodeluje pri združevanju (joining) Lv (jLv). Pomnožitev DNA, ki vključuje zaporedja DNA za kLv je uspela pri puranu, navadnem fazanu in poljski jerebici. S sestavo zaporedij, dobljenih z metodo verižne reakcije s polimerazo z različnimi začetnimi oligonukleotidi je bilo mogoče sestaviti zaporedja, ki so bila poslana tudi v podatkovno zbirko (GenBank, FJ 649651, FJ 649652, FJ 649653). Pomnožitev DNA, ki vključuje zaporedja DNA za joining regijo pa je poleg omenjenih treh vrst uspela tudi pri pavu (delno zaporedje).

Rezultati primerjave nukleotidnih zaporedij regije jLv kažejo, da so nukleotidna zaporedja navadnega fazana, poljske jerebice ter purana (skladno s filogenetskimi odnosi) bolj podobna zaporedju kokoši (99%, 98% in 97%) kot zaporedju race (85%, 84% ter 82%).

Podobno sliko, ki se prav tako sklada s siceršnjo delitvijo omenjenih ptic na galiformne in anseriformne, dobimo, če primerjamo nukleotidna zaporedja regije kLv navadnega fazana, poljske jerebice ter purana, z zaporedjem kokoši (92%, 88% ter 91%) in race (76%).

Nukleotidnega zaporedja za kLv pava nismo mogli dobiti, saj verižna reakcija s polimerazo z obojimi začetnimi oligonukleotidi (kljub optimizaciji z gradientnim mikroprocesorsko vodenim termostatom) ni uspela. Po vsej verjetnosti gre tu za nekoliko drugačno nukleotidno zaporedje na mestih prileganja začetnih oligonukleotidov.

5.1.2.2 Primerjava napovedanih aminokislinskih zaporedij

Določitev napovedanih aminokislinskih na osnovi nukleotidnih zaporedij navadnega fazana, purana in poljske jerebice kLv, ki so bila dobljena za kLv nam omogoča natančnejše primerjave tega dela Lv.

Kokošnjemu zaporedju za kLv je najbolj podobno napovedano aminokislinsko zaporedje navadnega fazana (96% identičnost), sledi zaporedje purana (85% identičnost), najmanj pa je kokošnjemu zaporedju podobno napovedano aminokislinsko zaporedje za kLv poljske jerebice (83% identičnost). Da je zaporedje navadnega fazana najbolj podobno kokošnjemu, je bilo glede na predhodne podatke o sorodnosti antigenskih determinant Lv kokoši in navadnega fazana mogoče pričakovati. Prav tako si lahko razlagamo, zakaj vzorci jerebice v DIBA testu ter imunoblotu niso reagirali z mAb 3C10, saj se zaporedje za kLv jerebice najbolj razlikuje od zaporedja kokoši, omenjena mAb pa so bila pridobljena proti kokošjim Lv.

Poravnava aminokislin kLv kaže na nekatere posebnosti Lv kokoši oziroma določene razlike od preostalih treh preučevanih vrst ptic. V prvem delu (19. aminokislina) imajo zaporedja kLv purana, poljske jerebice ter navadnega fazana delecijo aminokislina glede na kLv zaporedje kokoši (delno zaporedje NEATKATL) in race (delno zaporedje SSQNKATL), prikazano v Prilogi B (Slika 20). Linija omenjenih treh vrst ptic (puran, poljska jerebica, navadni fazan) se je v evoluciji najverjetneje razcepila kasneje, kot pa se je odcepila od skupne linije s kokošjo oziroma skupne predniške linije kokoši in race. Delecije so namreč veliko bolj redki dogodki kot substitucije nukleotidov, so relativno ireverzibilni dogodki v evoluciji proteinov. Zelo malo verjetno je, da bi se vzporedne delecije/insercije pojavljale v ločenih genih (Nolan in Margoliash, 1968).

Kot je že bilo objavljeno (Reynaud in sod., 1983; Grant in sod, 1971) je tudi C- terminalni del kokošje Lv dokaj izjemen, ker se konča s cisteinom in ne serinom (delno zaporedje KRSEC). Z izjemo Lv race (delno zaporedje NKSEC) imajo druge ptice, za katere smo določili ustrezno zaporedje, na koncu serin (KRSECS). Izgleda, da je v času evolucije v genu kokoši (in race) prišlo do točkovne mutacije (sprememba kodona TCT v TAA), ki je povzročila izgubo zadnje aminokislina Lv (serina). Manj verjetno je, da je pri drugih vrstah ptic (in sesalcih) prišlo do mutacije, ki je stop kodon (TAA) spremenila v kodon za serin (TCT).

V aminokislinskem zaporedju za kLv Ig celične linije limfocitov B (DT40) je na 90. mestu asparagin, medtem ko je na istem mestu sicer pri kokoših lahko aspartatna kislina. Polimorfizem so opisali že Reynaud in sod. (1983) ter Parvari in sod. (1987), ki so menili, da je taka zamenjava lahko povezana z alotipom Lv kokoši.

N- terminalno aminokislinsko zaporedje Lv navadnega fazana je bilo v 19 določenih aminokislinah identično zaporedjem kokoši in purana (Grant in sod., 1971, Reynaud in sod., 1983). To velja tudi za drugo zaporedje v Lv navadnega fazana (GYQAEDEAVY), ki je identično zaporedju Lv kokoši (aminokislina 72-81), ki so ga objavili Reynaud in sod. (1983). V Lv kokoši omenjeno zaporedje predstavlja regijo pred CDR3 (aminokislina 84-92). Glede na podobnost v aminokislinskem zaporedju najverjetneje tudi novo dobljeno zaporedje navadnega fazana pripada omenjeni regiji. Skupno smo torej določili za Lv navadnega fazana 145 aminokislin, od tega 29 v variabilnem delu z določitvijo aminokislinskega zaporedja ter 13 aminokislin jLv in 103 aminokislina v kLv z določitvijo nukleotidnega zaporedja in prevedbo v aminokislinsko zaporedje (Slika 16). Skupaj to predstavlja ~70% Lv navadnega fazana. Preseneča nas dejstvo, da N- terminalnega zaporedja Lv diamantnega fazana ni bilo mogoče določiti, domnevno zaradi blokirane N-terminusa. Res je, da ta vrsta fazana pripada drugemu rodu (*Chrysolophus*), vendar tudi pri kokoši, puranu in golobu N-terminalni deli Lv niso blokirani (Kubo in sod., 1970; Suzuki in Lee, 2004).

Glede na zelo šibke signale pri sekvenčni analizi Lv beloglavega jastreba v primerjavi s koncentracijo Lv vzorca je zelo verjetno, da je bila ta N- terminalno blokirana. Tako z izjemo zelo močne reakcije te Lv z mAb 3C10 in CH-31 nimamo (drugih) podatkov o njeni sorodnosti z Lv kokoši. Za take podatke bi bile potrebne nadaljnje raziskave, za katere pa je težko dobiti ustrezne vzorce, saj je beloglavi jastreb zaščitena vrsta.

5.1.2.2.1 Primerjava zaporedij za Lv

Suzuki in sod. so primerjali N- terminalna aminokislinska zaporedja Lv (19 aminokislin) goloba, kokoši in race in poročali, da je zaporedje goloba bolj sorodno zaporedju kokoši (79% identičnost). Če pri tovrstni primerjavi uporabimo pravilno zaporedje Lv kokoši (Reynaud in sod., 1983; Grant in sod., 1971), ugotovimo, da gre v resnici za drugačno razmerje identičnosti. Ob upoštevanju pravilnega zaporedja Lv kokoši je le-to bolj sorodno zaporedju race (79% identičnost), kot zaporedju goloba (63% identičnost). Vseeno pa se zaporedje Lv kokoši od znanih zaporedij najbolj ujema z zaporedjem purana ter zaporedjem fazana (podatki iz te raziskave), saj so omenjena zaporedja identična do CDR1 (Grant in sod., 1971).

Novo pridobljena napovedana aminokislinska zaporedja kLv purana kažejo razlike od zaporedij (Grant in sod., 1971) purana (zadnji del zaporedij za jLv (5 aminokislin), prvi del zaporedja za kLv (30 aminokislin) ter zadnji del zaporedja za kLv (33 aminokislin) na 9/67 mestih, to je 13.4%. Delna zaporedja istih avtorjev (Grant in sod., 1971) za jLv purana so identična in so na tem mestu identična tudi pri kokoši (Grant in sod., 1971; Reynaud in sod., 1983) ter novo pridobljenimi zaporedji jLv (Slika 16).

Delna zaporedja za kLv kokoši in purana (Grant in sod., 1971) se ravno tako razlikujejo od zaporedja za kLv kokoši avtorjev Reynaud in sod. (1983) na 9/67 mestih, kar ustreza 13.4% (Slika 16).

N- terminalno zaporedje 21 aminokislin Lv kokoši avtorjev (Kubo in sod., 1971) se od zaporedja za Lv kokoši avtorjev Reynaud in sod. (1983) ter McCormack (1989) razlikuje za 4 aminokislinske (ni prikazano).

5.1.2.2.2 Filogenetsko drevo

Filogenetsko drevo na osnovi metode združevanja sosedov (angl. »neighbor-joining«), narejeno z multiplo poravnavo nukleotidnih zaporedij kLv Ig pri prej omenjenih vrstah ptic (ClustalW) je pokazalo sledeče filogenetske odnose: puran in jrebica sta si filogenetsko najbližje, fazan je filogenetsko od njiju bolj oddaljen. Kokoš je znotraj reda Galliformes izmed primerjanih taksonov filogenetsko najbolj oddaljena. Raca, ki pripada redu Anseriformes, je pri vzpostavljanju molekularne filogenije predstavljala zunanjo skupino vsem preostalim vrstam (iz reda Galliformes). Enako topologijo filogenetskega drevesa smo dobili, če smo za poravnavo zaporedij in konstrukcijo filogenetskega drevesa uporabili bodisi aminokislino bodisi nukleotide.

Filogenetsko drevo, ki sem ga na podlagi poravnave nukleotidnih zaporedij kLv Ig izdelala s pomočjo metode združevanja sosedov, se v glavnih delitvah sklada z drugimi molekularno osnovanimi filogenijami (Bush in Strobeck, 2003; Kriegs in sod., 2007) skupin znotraj reda Galliformes.

Obe predlagani filogeniji se skladata po tem, da je kokoš domnevno filogenetsko bolj oddaljena od ožje taksonomske skupine znotraj družine Phasianidae, ki zajema purana, fazana in jrebico. Za razliko od tega kažejo študije (Dyke in sod., 2003) na osnovi morfoloških znakov nekoliko drugačno razvrstitev. Purana uvrščajo v ločeno poddružino Melagrinae, medtem, ko preostale vrste, vključene v mojo molekularno filogenetsko primerjavo, uvrščajo skupaj v poddružino Phasianinae (kokoš, fazana in jrebico).

Z različnimi metodami dobimo različne topologije dreves. Uporabljena metoda združevanja sosedov je sicer enostavna in hitra, vendar uporablja pri konstrukciji filogenetskega drevesa lokalni optimalnostni kriterij, kar pomeni, da ne preveri vseh možnih filogenetskih dreves z različnimi razvrstitvami danih taksonomskih skupin.

Konstantni del lahke verige (kLv) je evlucijsko dobro ohranjen (Greenberg in sod., 1993) in omogoča medvrstno primerjavo nukleotidnih oziroma aminokislinskih zaporedij, vendar pa moramo glede na raven taksona, znotraj katerega preučujemo filogenetske odnose, izbrati ustrezno molekulo, ki ima temu primerne stopnje mutacij. Tako se naprimer zelo konzervirane regije načeloma dobro obnesejo na ravni redov in razredov, ne moremo pa avtomatično sklepati, da se obnesejo tudi na ravni nižjih taksonov, kot je naprimer družina.

Možno je torej, da predstavljeno filogenetsko drevo ne ustreza najbolj uporabljenim molekularno filogenetskim podatkom. Druga možna razlaga pa je v tem, da kažejo zaporedja različnih genov različne filogenetske vzorce evolucije, kar je posledica neodvisne evolucije različnih molekul v različnih filogenetskih linijah.

Na podoben način lahko razložimo tudi neskladje med morfološko in molekularno osnovanimi filogenijami. Morfološko osnovane filogenije so verjetneje povezane s filogenetskimi vzorci evolucije določenih razvojno in morfološko pomembnih regulatornih genov. Ti geni pa lahko kažejo precej drugačne filogenetske vzorce evolucije kot geni, ki jih izberemo kot podlago za molekularno filogenijo.

Izbrani geni za molekularno filogenetske študije ponavadi ustrezajo določenim kriterijem za filogenetsko relevantnost, kot je na primer hitrost evolucijskega spreminjanja, ki je ustrezna ravni preučevanja filogenije – za postavljanje filogenije taksonomskih skupin na višji ravni ponavadi uporabljamo zaporedja z nižjo hitrostjo mutacij, za filogenetske analize taksonomskih kategorij na nižji ravni pa zaporedja z višjo stopnjo mutacij.

Za razvojno in morfološko pomembne gene pa je lahko mutacijska stopnja različna in se lahko v evoluciji nenadoma spremeni. Filogenetski vzorci evolucije izbranih signifikantnih molekulskih znakov so tako lahko bistveno drugačni od filogenetskih vzorcev evolucije razvojno in morfološko pomembnih genov.

Če bi imela na razpolago več vzorcev DNA ptic, npr. prepelice, tragopana, večih rodov fazanov, bi lahko izdelala bolj natančno evolucijsko drevo. Še boljše bi bilo, če bi imela DNA ptic, pripadajočih sestrskim skupinam Phasianidae, torej: Odontophoridae, Numididae, Cracidae in Megapodiidae, saj bi tako lahko primerjala evolucijske odnose predstavnikov različnih družin, pri čemer bi z uporabo evolucijsko dobro ohranjene regije, dobila kladogram Galliformes. Pri tem je potrebno poudariti, da na osnovi takšnih rezultatov lahko skonstruiramo filogenetsko drevo imunskega odgovora, ki pa ni nujno identično s splošnim evolucijskim drevesom. Sklepanje iz ene fiziološke lastnosti na organizmično raven je tvegano in ne nujno relevantno.

5.2 SKLEPI

- Z mAb 3C10 in CH-31 smo z encimskoimunskima testoma (DIBA, imunoblot) testirali serume 25 različnih vrst ptic in ugotovili, da se mAb 3C10 veže na Ig 9 vrst ptic. Dokazali smo pozitivne reakcije mAb 3C10 z IgG: kokoši, navadnega, diamantnega ter Swinhojevega fazana, tragopana, purana, pava, pegatke ter beloglavega jastreba.
- Z ločevanjem podenot Ig in vezavo mAb 3C10 smo dokazali, da se omenjeno mAb veže na Lv diamantnega in Swinhojevega fazana ter beloglavega jastreba.
- Za Lv navadnega fazana, ki jo je prepoznavalo mAb 3C10, sta bili določeni N-terminalno zaporedje (19 aminokislin) in zaporedje pred CDR3 (10 aminokislin). Omenjeni zaporedji sta identični ustreznim zaporedjem Lv kokoši.
- Določili smo nukleotidna zaporedja, ki kodirajo jLv in kLv purana, navadnega fazana, poljske jerebice ter delno zaporedje jLv pava. Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska zaporedja in jih primerjali tudi z zaporedjem kokoši.
- Primerjava aminokislinskih zaporedij kaže na največjo podobnost zaporedij navadnega fazana in kokoši (100% identičnost jLv in 96% identičnost kLv zaporedij) in na drugi strani največjo podobnost zaporedij purana in poljske jerebice (92% identičnost jLv ter 89% identičnost kLv zaporedij).
- S primerjavo zaporedij Lv smo vzpostavili filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodstvene odnose med preučevanimi pticami in kokošjo. Kokoši je najbolj soroden fazan (95.7% identičnost napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv in kLv), manj puran (85.3% identičnost napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv in kLv) in najmanj jerebica (84.5% identičnost napovedanih aminokislinskih zaporedij jLv in kLv).

6 POVZETEK

V prvem delu naloge smo z mAb 3C10 in referenčnim mAb (CH-31) za Lv v encimskoimunskih testih (DIBA, imunoblot) testirali serume 15 vrst ptic, ki dosedaj še niso bili testirani.

Izkazalo se je, da se mAb 3C10 v DIBA testu (poleg serumskih vzorcev kokoši, purana, in fazana, za katere so bile reakcije že dokazane (Narat in sod., 2004)) močno veže tudi na serumske vzorce diamantnega in Swinhojevega fazana ter beloglavega jastreba.

Z obema mAb (3C10 in CH-31) so v DIBA testu reagirali tudi serumi sledečih ptic: sijajnega fazana, tragopana ter sončne aratinge.

MAb 3C10 ni reagiralo s serumi: japonske prepelice, različnih rac (indijske tekačice, nevestine race), različnih gosi (siva gos, kanadska gos, andaluzijska gos), črnega laboda, bele štorcklje, lesne sove, goloba, kanarčka, papige skobčevke, are in kakaduja ter Ig izoliranimi iz rumenjaka nojevega jajca.

MAb 3C10 je poleg reakcij z Lv kokoši in navadnega fazana v imunoblotu prepoznavalo Lv tudi pri vzorcih serumov purana, diamantnega fazana, tragopana in beloglavega jastreba.

Na serumske Ig sijajnega fazana, tragopana in sončne aratinge so se referenčna mAb CH-31 vezala bolje kot mAb 3C10. Medtem ko mAb 3C10 serumskih Ig pava v DIBA testu ne prepoznavata, pa se mAb CH-31 dobro veže tudi na Lv pava. Nasprotno pa je mAb 3C10 v DIBA testu in imunoblotu reagiralo s pegatkinimi IgG, medtem ko mAb CH-31 ni dalo reakcij z vzorci seruma pegatke.

Na osnovi primerov, iz katerih je razvidno, da se omenjeni monoklonski protitelesi vežeta različno, smo sklepali, da prepoznavata različne epitope na Lv različnih vrst ptic.

Za ugotavljanje teoretičnega mesta epitopa na kLv smo uporabili programsko orodje, s katerim smo določili teoretično najbolj antigena mesta na aminokislinskem zaporedju.

Podobnost oziroma različnost zaporedij Lv in kLv kokoši, purana, navadnega fazana, poljske jerebice ter race smo primerjali z reakcijami, ki so jih pokazala monoklonska protitelesa (3C10 in CH-31).

Za navadnega fazana smo z N- terminalno sekvenčno analizo pridobili aminokislinsko zaporedje in ugotovili, da je identično že znanima zaporedjema kokoši in purana.

V drugem delu naloge smo z metodo verižne reakcije s polimerazo pomnožili nukleotidna zaporedja, ki kodirajo kLv sledečih vrst: purana, navadnega fazana in poljske jerebice. Prav tako smo z metodo verižne reakcije s polimerazo pomnožili nukleotidna zaporedja, ki kodirajo jLv pri puranu, navadnem fazanu, poljski jerebici ter pavu (delno zaporedje).

Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska ter jih primerjali z znanim zaporedjem kokoši in narisali filogenetsko drevo, ki prikazuje sorodstvene odnose med preučevanimi vrstami ptic.

Primerjava zaporedij kaže na največjo podobnost zaporedij navadnega fazana in kokoši (99% identičnost jLv zaporedja in 92% identičnost kLv zaporedja v nukleotidnem zaporedju ter 100% identičnost jLv in 96% identičnost kLv zaporedja v aminokislinskem zaporedju) in obenem največjo podobnost zaporedij purana in poljske jerebice (98% identičnost jLv in 94% identičnost kLv zaporedja v nukleotidnem zaporedju ter 92% identičnost jLv ter 89% identičnost kLv dela v aminokislinskem zaporedju).

Omenjenim aminokislinskim zaporedjem smo s programskim orodjem določili teoretične izoelektrične točke ter molekulske mase proteinov.

7 VIRI

- Arakawa H., Buerstedde J. M. 2003. Immunoglobulin Gene Conversion: Insights From Bursal B Cells and the DT40 Cell Line. *Developmental Dynamics*, 229: 458-464
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402
- Bando Y., Higgins D. A. 1996. Duck lymphoid organs: their contribution to the ontogeny of IgM and IgY. *Immunology*, 89: 8-12
- Benatar T., Tkalec L., Ratcliffe M. J. 1992. Stochastic rearrangement of immunoglobulin variable-region genes in chicken B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 7615-7619
- Benčina D., Mrzel I., Zorman Rojs O., Bidovec A., Dovč A. 2003. Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. *Veterinary Record*, 152: 230-234
- Benčina D., Kleven S. H., Elfaki M. G., Snoj A., Dovc P., Dorrer D., Russ I. 1994. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36
- Benčina D., Narat M., Bidovec A., Zorman-Rojs O. 2005. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathology*, 34: 463-472
- Biček A. 2004. Mapiranje epitopov na kokošji IgY molekuli z monoklonskimi protitelesi. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 58 str.

- Bush K. L., Strobeck C. 2003. Phylogenetic relationships of the Phasianidae reveals possible non-pheasant taxa. *Journal of Heredity*, 94: 472-489
- Chiou V. 2002. Duck antibodies for IVD application: A naturally existing analog to mammalian antibodies offers an alternative with broad applications. *IVD Technology*, 6: 3396-3402
- Ch'ng L. K., Benedict A. 1981. The Phylogenetic Relationships of Immunoglobulin Allotypes and 7S Immunoglobulin Isotypes of Chickens and Other Phasianoids (Turkey, Pheasant, Quail). *Immunogenetics*, 12: 541-554.
- Davidson F., Kaspers B., Schat K. A. 2008. *Avian Immunology*. Academic Press: 473 str.
- Dyke G. J., Gulas B. E., Crowe T. M. 2003: Suprageneric relationships of galliform birds (Aves, Galliformes): a cladistic analysis of morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean society*, 137: 227-244
- Fumihito A., Miyake T., Takada M., Ohno S., Kondo N. 1995. The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*) and the chicken and junglefowls of the genus *Gallus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:11053-11056
- Geourjon C., Deléage G., Roux B. 1991. ANTHEPROT: an interactive graphics software for analysing protein structures from sequences. *J. Mol. Graph.*, 9: 188-190
- Grant J. A., Sanders B., Hood L. 1971. Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian lambda chains. *Biochemistry*, 10: 3123-3132
- Greenberg A. S., Steiner L., Kasahara M., Flajnik M. F. 1993. Isolation of a shark immunoglobulin light chain cDNA clone encoding a protein resembling mammalian κ light chains: Implications for the evolution of light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10603-10607

- Guex N., Diemand A., Peitsch M. C. 1999. Protein modelling for all. *TiBS* 24: 364-367
- Heyman B. 1996. Complement and Fc-receptors in regulation of the antibody response. *Immunol Lett* 54: 195-199
- Higgins D. A., Cromie R. L., Liu S. S., Magor K. E., Warr G. W. 1995. Purification of duck immunoglobulins: an evaluation of protein A and protein G affinity chromatography. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 44: 169-180
- Honjo T., Alt F. W., Neuberger M. S. 2004. *Molecular Biology of B cells*. Elsevier Academic Press: 629 str.
- Kaiser V. B., Van Tuinen M., Ellegren H. 2007. Insertion events of CR1 retrotransposable elements elucidate the phylogenetic branching order in galliform birds. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 338-347
- Karlsson M., Kollberg H., Larsson A. 2004. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World's Poultry Science Journal*, Cambridge University Press, 60: 341-348
- Kimball R. T., Braun E. L., Ligon J. D. 1997. Resolution of the phylogenetic position of the Congo peafowl, *Afropavo congensis*: a biogeographic and evolutionary enigma. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 1517-1523.
- Kriegs J. O., Matzke A., Churakov G., Kuritzin A., Mayr G., Brosius J., Schmitz J. 2007. Waves of genomic hitchhikers shed light on the evolution of gamebirds (Aves: Galliformes). *BMC Evolutionary Biology*, 7: 190
- Kubo R. T., Rosenblum I. Y. 1970. The Unblocked N- Terminal Sequence of Chicken IgG λ - Like Light Chains. *The Journal of Immunology*, 105: 534-536
- Kubo R. T., Rosenblum I. Y., Benedict A. A. 1971. Amino Terminal Sequences of Heavy and Light Chains of Chicken Anti-Dinitrophenyl Antibody. *The Journal of Immunology*, 107: 1781-1784

- Leslie G. A., Benedict A., III. 1970. Antigenic Relationships of the Immunoglobulins of the Chicken, Pheasant and Japanese Quail. *The Journal of Immunology*, 104: 810-817
- Leslie G. A., Clem L. W. III. 1969. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*, 130: 1337-1352
- Lundqvist M. L., Middleton D. L., Hazard S., Warr G. W. 2001. The immunoglobulin heavy chain locus of the duck. Genomic organization and expression of D, J and C region genes. *J. Biol. Chem.*, 276: 46729-46736
- Lundqvist M. L., Middleton D. L., Radford C., Warr G. W., Magor K. E. 2006. Immunoglobulins of the non- galliform birds: Antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 93-100
- Magor K. E., Higgins D. A., Middleton D. L. Warr G. W. 1994a. cDNA sequence and organization of the immunoglobulin light chain gene of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Developmental and Comparative Immunology*, 18: 523-531
- Magor K. E., Higgins D. A., Middleton D. L., Warr G. W. 1994b. One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *The Journal of Immunology*, 153: 5549-5555
- Magor K. E., Warr G. W., Middleton D., Wilson M. R., Higgins D. A. 1992. Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence. *The Journal of Immunology*, 149: 2627-2633
- McCarthy C. 1998. Chromas. Software. Griffith University, Brisbane, Queensland, Australia, Technelysium Pty Ltd.
- McCormack W. T., Hurley E. A., Thompson C. B. 1993. Germ Line Maintenance of the Pseudogene Donor Pool for Somatic Immunoglobulin Gene Conversion in Chickens. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 821-830

- McCormack W. T., Tjoelker L. W., Carlson L. M., Petryniak B., Barth C. F., Humphries E. H., Thompson C. B. 1989. Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell*, 56: 785-791
- Mockett A. P. A. 1986. Monoclonal antibodies used to isolate IgM from chicken bile and avian sera and to detect specific IgM in chicken sera. *Avian Pathology*, 15: 337-348.
- Narat M., Biček A., Vadnjal R., Benčina D. 2004. Production, Characterization and Use of Monoclonal Antibodies Recognizing IgY Epitopes Shared by Chicken, Turkey, Pheasant, Peafowl and Sparrow. *Food Technol. Biotechnol.*, 42: 175-182
- Nolan C., Margoliash E. 1968. Comparative Aspects of Primary Structures of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 37: 727-791
- Ognev S. I. 1956. *Zoologija kralješnjaka*. Zagreb. Školska knjiga: 846 str.
- Parvari R., Ziv E., Lantner F., Shoshana T. O., Burstein Y., Schechter. 1987. Analyses of chicken immunoglobulin light chain cDNA clones indicate a few germline V λ genes and allotypes of the C λ locus. *The EMBO Journal*, 6: 97-102
- Parvari R., Ziv E., Lantner F., Heller D., Schechter I. 1990. Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations. *Immunology*, 87: 3072-3076
- Pastoret P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A. 1998. *Handbook of vertebrate immunology*. San Diego, Academic Press. Str. 73-117
- Paul W. E. 2003. *Fundamental Immunology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers: 1027 str.
- Rozen S., Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132: 365-386

- Radovanović M. 1965. Zoologija. Drugi deo. Sistematika životinja. Naučna knjiga: 617 str.
- Ratcliffe M. J. 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 101-118
- Reynaud C. A., Anquez V., Grimal H., Weill J. C. 1987. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell*, 48: 379-388
- Reynaud C. A., Anquez V., Dahan A., Weill J. C. 1985. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. *Cell*, 40: 283-291
- Reynaud C. A., Dahan A., Weill J. C. 1983. Complete sequence of a chicken lambda light chain immunoglobulin derived from the nucleotide sequence of its mRNA. *PNAS*, 80: 4099-4103
- Roitt I., Brostoff J., Male D. 1998. *Immunology 5th Ed.*, Mosby: 423 str.
- Smith R. F., Wiese B. A. Wojzynski M. K., Davidson D. B., Worley K. C. 1996. BCM Search Launcher- an intergated interface to molecular biology data base search and analysis service available on the World Wide Web. *Genome Res.* 6: 454-462
- Strauss. W. 1998. Isolation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. New York: John Wiley and Sons, str. 2.2.1-2.2.3
- Suzuki N., Khoo K. H., Chen C. M., Chen H. C., Yuan C., Lee Y. C. 2003. N-Glycan Structures of Pigeon IgG: A major serum glycoprotein containing Gal α 1-4 Gal termini. *J. Biol. Chem.*, 278: 46293-46306
- Suzuki N., Laskowski M., Lee Y. C. 2004a. Phylogenetic expression of Gal α 1-4Gal on avian glycoproteins: Glycan differentiation inscribed in the early history of modern birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101: 9023-9028

Suzuki N., Lee Y. C. 2004b. Site specific N- glycosylation of chicken serum IgG.
Glycobiology, 14: 275-292

Škornik I. 2006. Sto slovenskih ptic. Modrijan: 264 str.

Thompson C. B., Neiman P. E. 1987. Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell*, 48: 369-378

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680

Tizard I. 2002. The avian antibody response. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 11: 2-14

Trontelj P. 2008. Univerza v Ljubljani. Oddelek za biologijo. Povzetek predavanj pri predmetih Sistematska zoologija strunarjev in Osnove sistematske zoologije II http://web.bf.uni-lj.si/bi/zoologija/peter_trontelj/uvod_ptice.htm (5.julij 2008): 4 str.

Van Nerom A. Ducatelle R., Haesebrouck F., Arnouts S., Goddeeris B., Davidson T. F., Kaspers. B. 1997. Monoclonal and polyclonal antibodies to chicken immunoglobulin isotypes specifically detect turkey immunoglobulin isotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57: 305-314

Van Tuinen M., Sibley C. G., Hedges S. B. 2000. The Early History of Modern Birds Inferred from DNA Sequences of Nuclear and Mitochondrial Ribosomal Genes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 451-457

Vozelj M. 1996. Imunologija: enciklopedijski priročnik. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 371 str.

Vozelj M. 1985. Temelji imunologije, Ljubljana, DZS: 469 str.

Warr, G. W., Magor, K. E., Higgins, D. A. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16: 392-398

Winding P., Berchtold M. W. 2001. The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *Journal of Immunological Methods*, 249: 1-16

Yung F. W., Hung J. L., Shioh H. C., Long H. L. 2007. Sequence and phylogenetic analysis of interleukin (IL)-1 β -encoding genes of five avian species and structural and functional homology among these IL-1 β proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116: 37-46

Zorman-Rojs O., Zdovc I., Benčina D., Mrzel I. 2000. Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian diseases*, 44: 1017-1022

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Dovču za mnoge znanstvene ideje, za pomoč in spodbudo ter strokovne komentarje o mojem delu.

Prof. dr. Vladimirju Kotniku se zahvaljujem za hiter pregled diplomskega dela ter strokovno vprašanje in mnenje. Ravno tako za prijaznost in razumevanje.

Prof. dr. Miklavžu Grabnarju hvala za opombe in nekatere strokovne (biološke in genetske) zaznamke in še posebej, ker si je vzel čas priti na moj zagovor.

Prof. dr. Mojci Narat se zahvaljujem za celično kulturo, prostor na računalniku, za pomoč in razumevanje ter spodbudo.

Ivanki in Rebeki hvala za pomoč v laboratoriju, vselej spodbudne besede, dobro vzdušje, prijateljstvo in široko srce.

Za lep sprejem in pripravljenost pomagati se zahvaljujem vsem iz laboratorija: gospe Vidi, Roku, Anji, Sebastijanu, Jerneju, Andreju, Sonji, Barbari, Urški, Ireni, Daliborki, Simoni, Zali, Ani, Gašperju.

Atiju hvala za vse v življenju. Tako njegovo neprecenljivo široko znanje, kot dobrota mi bosta vedno za zgled.

PRILOGE

PRILOGA A

A 1 Taksonomska uvrstitev preučevanih ptic

Vse vrste ptic prikazane v Preglednici 12, ki so bile preučevane v nalogi, bodisi so bili vzorci serumov testirani v encimskoimunskih testih, bodisi je bila DNA pomnoževana z metodo verižne reakcije s polimerazo, sodijo med neognatne ptice (Neognathae).

Preglednica 12: Taksonomska uvrstitev preučevanih ptic (povzeto po NCBI, Taxonomy browser).

Vrstno ime	Rod	Poddružina	Družina	Red	Latinsko ime
Kokoš	<i>Gallus</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Gallus gallus</i>
Navadni fazan	<i>Phasianus</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Phasianus colchicus</i>
Diamantni fazan	<i>Chrysolophus</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Chrysolophus amherstiae</i>
Sijajni fazan	<i>Lophophorus</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Lophophorus impejanus</i>
Swinhojev fazan	<i>Lophura</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Lophura swinhoie</i>
“Teminck” tragopan	<i>Tragopan</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Tragopan temminckii</i>
Pav	<i>Pavo</i>	Phasianinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Pavo cristatus</i>
Prepelica	<i>Coturnix</i>	Perdicinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Coturnix coturnix</i>
Poljska jerebica	<i>Perdix</i>	Perdicinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Perdix perdix</i>
Puran	<i>Meleagris</i>	Meleagridinae	Phasianidae	Galliformes	<i>Meleagris gallopavo</i>
Pegatka	<i>Numida</i>	/	Numididae	Galliformes	<i>Numida meleagris</i>
Raca mlakarica	<i>Anas</i>	/	Anatidae	Anseriformes	<i>Anas platyrhynchos</i>
Moskovska raca	<i>Cairina</i>	/	Anatidae	Anseriformes	<i>Cairina moschata</i>
Nevestina raca	<i>Aix</i>	/	Anatidae	Anseriformes	<i>Aix sponsa</i>
Navadna gos	<i>Anser</i>	/	Anatidae	Anseriformes	<i>Anser anser</i>
Črni labod	<i>Cygnus</i>	/	Anatidae	Anseriformes	<i>Cygnus atratus</i>
Beloglavi jastreb	<i>Gyps</i>	Accipitrinae	Accipitridae	Falconiformes	<i>Gyps fulvus</i>
Sokol selec	<i>Falco</i>	/	Falconidae	Falconiformes	<i>Falco peregrinus</i>
Lesna sova	<i>Strix</i>	/	Strigidae	Strigiformes	<i>Strix aluco</i>
Sončna aratinga	<i>Aratinga</i>	/	Psittacidae	Psittaciformes	<i>Aratinga solstitialis</i>
Ara	<i>Ara</i>	/	Psittacidae	Psittaciformes	<i>Ara glaucogularis</i>
Kakadu	<i>Cacatua</i>	/	Cacatuidae	Psittaciformes	<i>Cacatua leadbeateri</i>
Skobčevka	<i>Melopsittacus</i>	/	Psittacidae	Psittaciformes	<i>Melopsittacus undulatus</i>
Sivi žako	<i>Psittacus</i>	/	Psittacidae	Psittaciformes	<i>Psittacus erithacus</i>
Skalni golob	<i>Columba</i>	/	Columbidae	Columbiformes	<i>Columba livia</i>
Domači vrabec	<i>Passer</i>	Passeroidea	Passeridae	Passeriformes	<i>Passer domesticus</i>
Bela štorclja	<i>Ciconia</i>	/	Ciconiidae	Ciconiiformes	<i>Ciconia ciconia</i>

PRILOGA B

B1 Zaporedja za lahke verige

B 1.1 Zaporedja kLv

B 1.1.1 Nukleotidna zaporedja, ki vključujejo kLv

V nadaljevanju so navedena nukleotidna zaporedja, ki vključujejo kLv. Del zaporedij, ki kodira kLv, je podčrtan.

>Puran

ATGTATGGATGGGTGGATGTGTTTGTACACGTGCATGTACATGCACACACATATG
TACACCCATACATACATGTGTGGCCGCTCTGCTTCTCTCCTGCAGGCCAGCCCAA
GGTGGCCCCCACCATCACCTCTTCCCACCATCAAAGGAGGAGCTGGATCAGAAC
AAGGCCACCCTAGTGTGCCTGATAAGCGACTTCTACCCCAGCCCGGTGACAGTGG
AGTGGCTGGTCGATGGCTCCACCCGGAAAGGCGAGACCACACCAGCGCAGCGGC
AGAGCAACAGCCAGTACATGGCCAGCAGCTACCTGTCACTGACTGCCAGCGACT
GGTCAAGTCACGAGACCTACACCTGCAGGGTCACACACGATGGCACCCGCTGTCAC
GAAGACCCTGAAGAGGTCCGAGTGCTCTTAGTCCCCTGGGGATGCGATGTGAG
GACGGTGGTTCCTCACCTCCCTGTCCCTCTGGGCCACTGCTGGTGGCAGCAGCC
CCCCTTCCCCTCAGATGTCCCCACCGTGCCCCCACCACCACCTCTGCCTGTT
GCCTCCTCTTGCCTCCATCCCTCCAGATGTCACATTAATAAACATGACACTGAACT
AGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTGCG

>Navadni fazan

ATGGATGGGTGGATGTGTTTGTTTTACAGATGTACCTGTATGTACATACACACAC
GTATGTGCAGCCATACACACACGTGTGGCCGCTCTGCCTCTCTCTTGCAGGCCAG
CCCAAGGTGGCCCCCACCATCACCTCTTCCCACCATCAAAGGAGGAGCTGGAAA
GCACCAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATAAACGACTTCTACCCCAGCCCGGTGAC
CGTGGATTGGGTGATCGATGGCTCCACCCGCAGTGGCGAGACCACAGCACCCGA
GCGGCAGAGCAACAGCCAGTACATGGCCAGCAGCTACCTGTCACTGTCTGCCAGC
GACTGGTCAAGCCACGAGACCTACACCTGCAGGGTCACACACGATGGCACCTCTA
TCACGAAGACCCTGAAGAGGTCCGAGTGCTCTTAGTCCCCTGGGGATGCGATGT

GAGGACGGTGATTCCCTCACCTCCCTGTCCCTCCGGGCCACTGCTGGTGACAGCA
GCCCCACTTCCCCTCAGATGTCTCCACCGTGCCCCATCACCCACTTCTGCCT
GTCGCCTCCTCTTGCCCCATCCCTCCAGATGTCACATTAATAAACATGACACTGA
ACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTGCG

>Poljska jerebica

ATGGATGGGTGGATGTGTTTGTGTTTACAGATGTACATGTGTTTATATACGTACACA
CACATATGTACACCCATACACACACGTGTGGCCGCTCTGCCTCTCTCTTGCAGGA
CAGCCCAAGGTGGCCCCACCATCACCTCTTCCCACCATCAAAGGAGGAGCTGG
AACAGGGCAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATAAACGACTTCTACCCCAGCCCGGT
GACTGTGGAGTGGCTGGTCGACGGCTCCACACAGCGTGGCGAGACCACAGCAGC
GCAGCGGCAGAGCAACAGCCAGTACATGGCCAGCAGCTACCTGACACTGACTGC
CAGCAACTGGTCGAGCCACGAGACCTACACCTGCAAGGTCACACACGAAGGCAC
CACTGTCACGAAGACCCTGAAGAGGTCCGAGTGCTCTTAGTCCCCTGTTGATGC
GATGTGAGGATGGTGGTTCCCTCACCTCCCTGTTCCCTCTGGGCCACTGCTGGTGAC
AGCAGCCCCACTTCTCACTCAGATGTTCCCCACCATGCCCCACCACCCACCTCT
GCCTGTCGCCTCCTCTTGCGCCCATCCCTCTAGATGTCACATTAATAAACATGACA
CTGAACTAGTGCTGACTCTGCATCCATGTCTCTGTGTCCTTTTGCG

B 1.1.2 Napovedana aminokislinska zaporedja kLv

Dobljena nukleotidna zaporedja za CL sem prevedla v aminokislinsko zaporedje s programom Bcm search launcher pri nastavitvi "Six Frame Translation". V nadaljevanju je zapis aminokislin treh preučevanih vrst ptic v enočrkovnih kodah.

>Navadni fazan

QPKVAPTITIFPP

SKEELESTKATLVCLINDFYSPVTVDWVIDGSTRSGETTAPQRQNSQY

MASSYLSLSASDWSSHETYTCRVTHDGTSITKTLKRSECS

>Poljska jerebica

QPKVAPTITLFPF

SKEELEQGKATLVCLINDFYSPVTVEWLVDGSTQRGETTAAQRQNSQY

MASSYLTLTASNWSSHETYTCKVTHEGTTVTKTLKRSECS

>Puran

QPKVAPTITLFPFSKE

ELDQNKATLVCLISDFYSPVTVEWLVDGSTRKGETTPAQRQNSQYMAS

SYLSLTASDWSSHETYTCRVTHDGTA VTKTLKRSECS

B 1.2 Zaporedja jLv

B 1.2.1 Nukleotidna zaporedja, ki vključujejo jLv

V nadaljevanju so navedena nukleotidna zaporedja, ki vključujejo jLv. Del zaporedij, ki kodira jLv, je podčrtan.

>Poljska jerebica

GGTTTTTGCATTGCTCCATATCACTGTGTGGTATATTTGGGGCCGGGACCACCCTG
ACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCATTGTGAAAT
TGTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTTGGGGGT

>Puran

GGTTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTCGGGACCGGGACAACCCTG
ACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCATTGTGAAAT
TGTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTTGGGGGT

>Navadni fazan

GGTTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTTGGGGCCGGGACCACCCTG
ACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCATCGTGAAAT
TGTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTTGGGGGT

B 1.2.2 Primerjava nukleotidnih zaporedij jLv

```
FAZAN          -----GGTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACCACC 53
KOKOS          AGTGGGAGGTTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACAACC 60
JEREBICA       AGTGGGAGGTTTTTGCATTGCTCCATATCACTGTGTGGTATATTGGGGCCGGGACAGCC 60
PURAN          AGTGGGAGGTTTTTGCATTGCTCCGTATCACTGTGTGGTATATTGGGACCAGGACAGCC 60
PAV            -----GGGACGGGGACACAC 15
                *** * ***** *
```



```
FAZAN          CTGACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATT 113
KOKOS          CTGACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATCGTGAAATT 120
JEREBICA       CTGACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATTGTGAAATT 120
PURAN          CTGACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATTGTGAAATT 120
PAV            TGGACCGTCCTAGGTGAGTCGCTGACCTCGTCTCGGTCTTTCTTCCCCCATTGTGAAATT 75
                ***** *****
```



```
FAZAN          GTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTGGGGGT-- 147
KOKOS          GTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTGGGGGTTI 156
JEREBICA       GTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTGGGGGT-- 154
PURAN          GTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTGGGGGTAA 156
PAV            GTGACATTTGGTCGATTTTTGGTGATTGGGGGTAA 111
                ***** *****
```

Slika 19: Poravnava nukleotidnih zaporedij za jLv (ClustalW), kjer smo dodali delno zaporedje pava.

B 1.2.3 Napovedana aminokislinska zaporedja jLv

>Poljska jerebica

GIFGAGTTLTVLG

>Puran

GIFGTGTTTLTVLG

>Navadni fazan

GIFGAGTTLTVLG

B 1.3 Združena napovedana aminokislinska zaporedja (jLv+kLv)

```
Jerebica      GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITLFPSPKEEL-EQGKATLVCLINDFYSPVTVVEWLVDGS 59
Puran       GIFGTGTTTLTVLGQPKVAPTITLFPSPKEEL-DQNKATLVCLISDFYSPVTVVEWLVDGS 59
Kokos        GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITLFPSPKEELNEATKATLVCLINDFYSPVTVVDWVIDGS 60
Fazan        GIFGAGTTLTVLGQPKVAPTITIFPSPKEEL-ESTKATLVCLINDFYSPVTVVDWVIDGS 59
Raca         GVFGAGTTLTVLGQPKVSPTVHVFPSPDEEISSQNKATLVCLMSDFYSPVTVTWKVNDS 60
*:**:*:*****:***: :****.***: . *****: .***** * ::**

Jerebica      TQRG--ETTAAQRQSNQYMASSYLILTASNWSSHETTYTCKVIHEGTTVIKILKRSECS 116
Puran       TRKG--ETTAPQRQSNQYMASSYLSLTASDWSSHETTYTCRVTHDGTAVTKILKRSECS 116
Kokos        TRSG--ETTAPQRQSNQYMASSYLSLSASDWSSHETTYTCRVTHNGTTSITKILKRSEC- 116
Fazan        TRSG--ETTAPQRQSNQYMASSYLSLSASDWSSHETTYTCRVTHDGTSTITKILKRSECS 116
Raca         TRSSGVETSASQRQSNQYMASSYLTLSEWKGANSVVCQVTHDGTPIEKTILNKSEC- 118
*: . **:.*****:*****:***:*.. :: .*:***:***: :***:***
```

Slika 20: Poravnava napovedanih aminokislinskih zaporedij za jLv+kLv, poleg galiformnih ptic dodana raca (GenBank, S4944).

PRILOGA C

C 1 Encimskoimunski testi

C 1.1 Pregled serumov različnih vrst ptic, ki so bili testirani v encimskoimunskih testih

1. Serumi sledečih vrst ptic so že bili testirani (10 vrst) (Narat in sod., 2004): kokoš, puran, fazan, pav, japonska prepelica, raca, gos, vrabec, golob, skobčevka.

2. Testirani v tej nalogi (15): diamantni fazan, sijajni fazan, Swinhojev fazan, tragopan, poljska jerebica, prepelica, pegatka, črni labod, bela štorclja, lesna sova, beloglavi jastreb, sončna aratinga, ara, kakadu, kanarček.

C 2 DIBA test z mAb 3C10 in CH-31, ki prepoznavajo lahke verige

Na sliki 20 so prikazane reakcije serumov različnih rodov fazanov, pava, tragopana in pegatke z mAb 3C10 ter referenčnim mAb CH-31 v DIBA testu. Reakcije so kvantitativno ovrednotene v Preglednici 6.

navadni fazan	3C10	
	CH31	
sijajni fazan 1	3C10	
	CH31	
sijajni fazan 2	3C10	
	CH31	
diamantni fazan	3C10	
	CH31	
Swinhojev fazan	3C10	
	CH31	
tragopan	3C10	
	CH31	
pegatka	3C10	
	CH31	
pav	3C10	
	CH31	
kokoš	3C10	
	CH31	

Slika 21: Rezultati reakcije mAb 3C10 ter referenčnega CH-31 s serumi ptic reda Galliformes v DIBA testu.

C 3 DIBA test z mAb 1F5 in M1, ki prepoznavajo težke verige

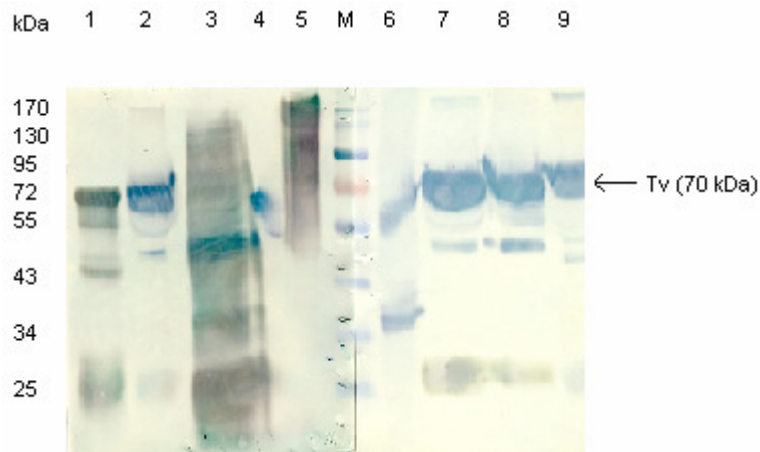
Preglednica 13: Rezultati DIBA testa z mAb 1F5, ki prepoznava težke verige IgM ter referenčnega M1 (Mockett, 1986).

Izvor seruma (vrsta ptice)	Rezultat DIBA testa pri različnih redčitvah serumov z mAb 1F5 in referenčnim M1					
	1:1000		1:10000		1:100000	
	1F5	M1	1F5	M1	1F5	M1
Sončna aratinga	+++	++	+++	++	NT	NT
Beloglavi jastreb	+++	++	+++	+	-	-

Opomba: ocena reakcij: +++ zelo močna reakcija; ++ močna reakcija; + vidna pozitivna reakcija; (+) komaj zaznavna reakcija; - negativna reakcija; NT ni bilo testirano. Vzorca serumov smo dobili z univerze v Giessen-u (Ursula Heffels-Redmann).

C 4 Imunoblot z mAb, ki prepoznavajo težke verige

Na Sliki 19 so prikazane steze na membrani, na katero so bili nanešene podenote Ig, potem, ko so bile ločene z elektroforezo ob dodatku 5% β -ME na Lv in Tv. Protitelesa mAb M1 (Mockett, 1986) so bila vezana za tem, ko so bila vezana mAb 3C10 in CH-31 (Sigma) (zaporedni imunoblot). Reakcije mAb M1 s Tv (70 kDa) kokoši, purana, pegatke, jerebice, diamantega in navadnega fazana ter tragopana, so nakazane s puščico.



Slika 22: Vezava mAb M1 na težke verige IgM. Steze: 1: kokoš*, 2: puran*, 3: beloglavi jastreb*, 4: pegatka*, 5: pav*, M: označevalec molekulskih mas; lestvica je označena na levi strani slike, 6: jrebica*, 7: diamantni fazan*, 8: navadni fazan*, 9: tragopan* (* pomeni dodatek β -merkaptetoanola).

PRILOGA D

D 1 Verižna reakcija s polimerazo

Preglednica 14: Pregled verižnih reakcij s polimerazo z DNA negaliformnih ptic.

Izvor DNA	Kombinacija začetnih oligonukleotidov		
	CONSTANT F1 + CONSTANT R1	CLF + LIGHT R	JOINING F + JOINING R
Raca mlakarica	NT	-	+
Gos	-	-	NT
Golob	NT	-	-
Lesna sova	NT	-	-
Sokol selec	NT	-	NT
Skobčevka	NT	-	NT
Sivi žako	NT	-	NT
Brinovka	NT	-	NT

Opomba: - verižna reakcija s polimerazo ni uspela, NT- ni bilo testirano